

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
д.ф.-м.н. Васютинский Олег Святославович

Санкт-Петербург — 2023

Оглавление

	Стр.
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1 Фотосенсибилизированная генерация синглетного кислорода в растворах, на поверхностях и в клетках	12
1.1.1 Фотосенсибилизатор хлоринового ряда Радахлорин	17
1.2 Процессы фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизаторов	20
1.2.1 Фотообесцвечивание фотосенсибилизаторов хлоринового ряда в водных и органических растворах	23
1.3 Применение время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для исследования процессов фотодинамического воздействия	25
1.4 Применение методов фазовой визуализации для исследования биологических объектов	32
1.4.1 Современное состояние автоматизации голографического мониторинга и классификации фазовых объектов	36
Глава 2. Исследование время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода и процессов фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизатора Радахлорин при напылении их на органические поверхности струей аэрозоля	39
2.1 Исследование люминесценции синглетного кислорода в струе аэрозоля фотосенсибилизатора Радахлорин при разных условиях оксигенации раствора	40
2.2 Сравнительный анализ время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода на органических и неорганических поверхностях при изменении концентрации кислорода в растворе	47

2.3	Исследование процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на органических и неорганических поверхностях при изменении концентрации кислорода в растворе	55
Глава 3. Исследование время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах и во внутриклеточной среде		
		68
3.1	Влияние кислотности и полярности растворов на параметры время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин	69
3.2	Определение параметров время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого с помощью фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах разной кислотности и полярности	77
3.3	Анизотропия флуоресценции и время вращательной диффузии фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах разной кислотности, вязкости и полярности при одно- и двухфотонном возбуждении	81
3.4	Анализ времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин во внутриклеточной среде в зависимости от условий микроокружения	92
Глава 4. Разработка голографического метода автоматического определения состояния клеток при фотодинамическом воздействии		
		106
4.1	Алгоритм автоматической сегментации фазовых изображений клеточных структур, полученных с помощью внеосевой цифровой голографической микроскопии	108
4.2	Голографическая микроскопия и томография как метод мониторинга динамики изменения параметров клеточных структур в результате фотодинамического воздействия	115
4.3	Разработка автоматического определения отклика клеток на фотодинамическое воздействие на основе параметров, полученных голографическим методом	126

Заключение	137
Публикации по теме диссертации	140
Список литературы	142
Список сокращений и условных обозначений	165

Введение

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 фотодинами-

ческой 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 флуоресценции синглетного кислорода, генерируемого с помощью фотосенсибилизатора Радахлорин на органических и неорганических поверхностях. Определить времена генерации и жизни, а также относительный квантовый выход флуоресценции 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. Про-

- демонстрировано 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.

Научная 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 фото-

обесцвечивания 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.

Степень достоверности 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.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.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырёх глав и заключения. Общий объем диссертации составляет 165 страниц, включая 49 рисунков и 6 таблиц, список литературы из 220 наименований и список публикаций по теме диссертации, индексируемых в Web of Science из 15 наименований.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Фотосенсибилизированная генерация синглетного кислорода в растворах, на поверхностях и в клетках

Синглетный кислород (СК), являясь активной формой молекулярного кислорода, играет важную роль в биологических системах. Широко распространенный термин "синглетный кислород" 1O_2 принято употреблять в отношении молекул кислорода, находящихся в первом и втором возбужденном синглетном состоянии. Молекула кислорода O_2 имеет два синглетных низлежащих возбужденных электронных состояния $a_1\Delta g$ и $b_1\Sigma^+g$, расположенных на 0,96-0,98 эВ [22; 23] и 1,61-1,63 эВ [24] выше основного состояния соответственно. Стоит отметить, что молекула во втором возбужденном состоянии $b_1\Sigma^+g$ быстро релаксирует в первое возбужденное состояние $a_1\Delta g$, переход из которого в основное состояние запрещен, поэтому молекула кислорода в состоянии $a_1\Delta g$ обладает относительно большим временем жизни; характерные излучательные времена жизни для первого и второго возбужденного состояния составляют, соответственно, около 45 минут и 7-12 секунд в газовой фазе, и $10^{-6} - 10^{-3}$ и $10^{-11} - 10^{-9}$ секунд в растворах [25].

К настоящему моменту в научной литературе описано множество методов генерации синглетного кислорода в растворах, которые условно можно разделить на два класса: методы, предполагающие и не предполагающие использование оптического возбуждения на определенных длинах волн. Одним из широко применяемых химических методов получения синглетной формы кислорода является реакция распада перекиси водорода, например, в присутствии гипохлорита [26], таурин хлорамина [27] и других реагентов в водных растворах [28]. Высокоэффективная генерация синглетного кислорода в непрерывном потоке перекиси водорода и дальнейшее его применение были продемонстрированы в работе [29]. Отличительной особенностью химических методов генерации является отсутствие требования оптического возбуждения, поэтому они обладают неоспоримым преимуществом в ситуациях, когда использование света невозможно или ограничено.

Отдельно стоит отметить методы генерации синглетного кислорода, требующие облучение растворов на соответствующих длинах волн. Так, синглетный кислород может образовываться при облучении насыщенных озонем [30] растворов органических веществ, или малоэффективным методом прямого возбуждения молекул кислорода на длине волны 1270 нм, например в воде и в тяжелой воде, что было продемонстрировано в работе [31]. Вместе с тем, генерация активных форм кислорода, в частности синглетного кислорода, возможна на поверхности металлических наночастиц [32] при передаче энергии от локализованного поверхностного плазмонного резонанса к молекуле кислорода, а также на поверхности оксида титана [33] в процессе фотокаталитического окисления.

Однако, наиболее распространенным в научной литературе и широко применяемым в медицинских целях является фотосенсибилизированный метод генерации синглетного кислорода в ходе реакции типа II (см. рисунок 1.1) [34; 35]. Молекула фотосенсибилизатора (PS) в основном синглетном состоянии (S_0) под действием света переходит в возбужденное высоколежащее синглетное состояние (S_n) и быстро релаксирует в нижнее возбужденное синглетное состояние (S_1). В ходе интеркомбинационного перехода, возможном при спин-орбитальном взаимодействии, молекула фотосенсибилизатора из состояния S_1 оказывается в возбужденном долгоживущем триплетном состоянии (T_1). При контакте молекулы фотосенсибилизатора T_1 с молекулой кислорода O_2 происходит передача энергии, в результате чего происходит генерация синглетного кислорода. Стоит отметить, что с помощью фотосенсибилизатора могут образовываться и другие активные формы кислорода, такие как супероксиданион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), перекись водорода (H_2O_2), в ходе реакции типа I, основанной на переносе электрона при взаимодействии возбужденного фотосенсибилизатора T_1 с биологическими молекулами.

Фотосенсибилизированная генерация синглетного кислорода наиболее распространена в природе, так в растительных клетках основным источником синглетного кислорода 1O_2 является хлорофилл Р680 [36] в возбужденном триплетном состоянии, образованный в фотосистеме II или в светособирающих комплексах [37], а в природных водоемах синглетный кислород может образовываться с помощью растворённых хромофорных органических веществ, выступающих в качестве фотосенсибилизаторов [38].

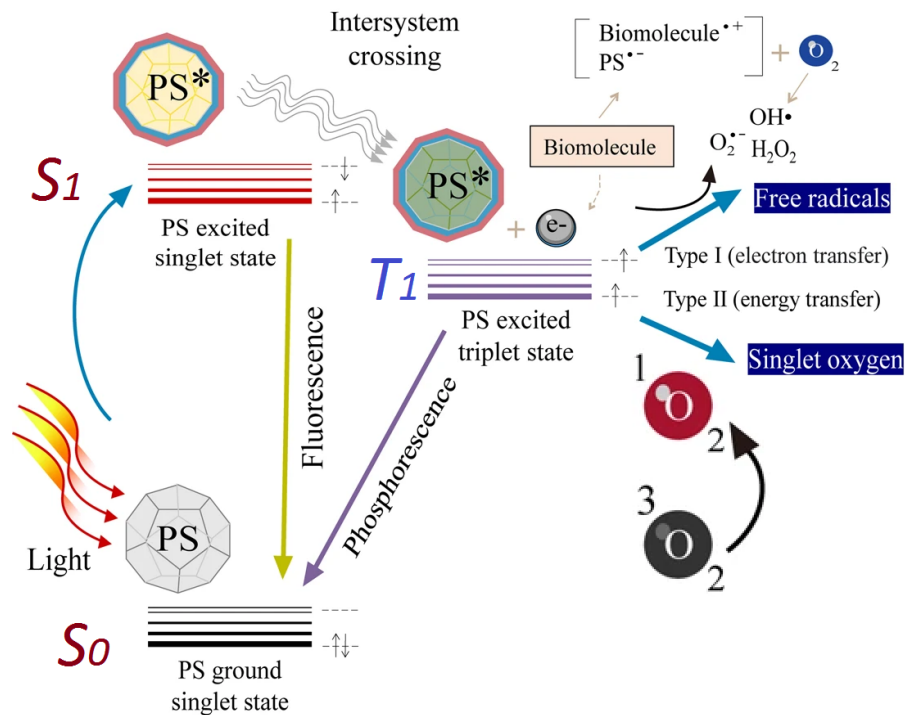


Рисунок 1.1 — Схема фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в результате реакции II типа и других активных форм кислорода при наличии органических молекул в ходе реакции I типа [35]

Детектирование синглетного кислорода, также как и его генерация, является важной задачей для подтверждения участия синглетного кислорода в химических реакциях [39] или его влияния на биологические системы [40]. В настоящее время в биологических системах распространен метод косвенного детектирования синглетного кислорода с помощью специальных флуоресцирующих меток, например на основе BODIPY [41] или коммерческого красителя "Singlet oxygen sensor Green@" [42]. Однако, большинство флуоресцентных маркеров синглетного кислорода также могут реагировать и на другие активные формы кислорода при разных условиях [43].

С другой стороны, синглетный кислород может быть обнаружен прямым детектированием сигнала фосфоресценции при излучательном переходе молекулы кислорода с нижнего возбужденного состояния $a_1\Delta_g$ в основное, разница энергий которых соответствует люминесценции на длине волны около 1270 нм [44]. Кроме регистрации интенсивности фосфоресценции СК, исследование времени жизни и генерации синглетного кислорода также представляют большой интерес. Принципиальная схема экспериментальной установки для регистрации время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода

представлена на рисунке 1.2 [45] при возбуждении молекул ФС импульсным лазером.

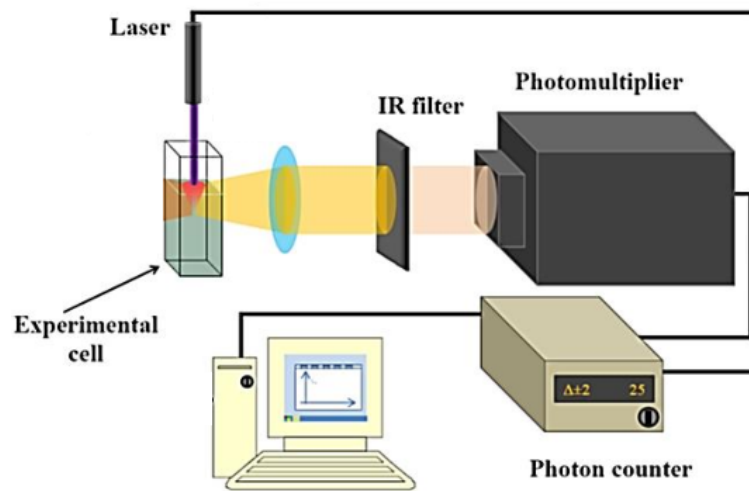


Рисунок 1.2 — Схема экспериментальной установки для регистрации время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода [45]

Временная зависимость числа молекул СК при импульсном возбуждении фотосенсибилизатора описывается выражением [46]:

$$[{}^1O_2](t) = \frac{\gamma_{\Delta} N_L (1 - 10^{-OD}) \tau_{\Delta}}{\tau_{\Delta} - \tau_T} \cdot (e^{-\frac{t}{\tau_{\Delta}}} - e^{-\frac{t}{\tau_T}})$$

где $[{}^1O_2]$ - концентрация молекул синглетного кислорода, γ_{Δ} - квантовый выход СК, N_L - количество квантов в лазерном импульсе, OD - оптическая плотность растворенного вещества на длине волны возбуждения, τ_{Δ} - время жизни синглетного кислорода, τ_T - время жизни триплетного состояния (время генерации синглетного кислорода).

Интенсивность фосфоресценции 1O_2 I_{ph} пропорциональна концентрации молекул СК и после упрощения может быть выражена формулой, широко используемой для анализа экспериментальных данных:

$$I_{ph} = \frac{\Phi}{\tau_{\Delta} - \tau_T} \cdot (e^{-\frac{t}{\tau_{\Delta}}} - e^{-\frac{t}{\tau_T}})$$

где Φ - параметр, включающий эффективность генерации синглетного кислорода.

Данный метод регистрации люминесценции на длине волны около 1270 нм в основном применяется для исследования синглетного кислорода в рас-

творах из-за его короткого времени жизни и чрезвычайно низкого квантового выхода фосфоресценции в биологических системах, где находится большое количество тушителей синглетного кислорода. Несмотря на то, что основным методом регистрации синглетного кислорода в клетках является косвенный метод с использованием флуоресцирующих меток, в клетках наблюдалось успешное прямое детектирование синглетного кислорода при полной или частичной замене внутриклеточной H_2O на D_2O [47; 48], где существенно увеличиваются времена затухания сигнала фосфоресценции СК.

Для обеспечения эффективной генерации синглетного кислорода фотосенсибилизатор должен обладать высоким коэффициентом поглощения на длине волны возбуждения, высоким квантовым выходом интеркомбинационного перехода, длинным временем жизни возбужденного триплетного состояния ($\tau > 1 \mu s$) и энергией триплетного состояния превышающей разницу энергий синглетного и триплетного состояния молекулы кислорода. На настоящий момент широко применяются как искусственно синтезированные, так и органические фотосенсибилизаторы, удовлетворяющие необходимым условиям. Из широко применяемых в исследованиях фотосенсибилизаторов можно отметить:

- Бенгальский розовый, возбуждаемый на длине волны 550 нм и обладающий высоким квантовым выходом СК около 0,75 в воде [49], используется как для антимикробной терапии [50] и фотохимического сшивания тканей [51], так и для лечения стоматологических заболеваний [52].
- Метиленовый синий, максимум спектра поглощения которого находится около 660 нм и квантовый выход синглетного кислорода равен 0,5, обычно применяется в антимикробной терапии, фотодинамической терапии рака, а также в качестве противомаларийного средства [53].
- Молекула феналенона в растворах приводит к генерации синглетного кислорода с квантовым выходом около 1 в $CHCl_3$, что часто используется для определения квантового выхода 1O_2 с помощью других фотосенсибилизаторов [34]. Однако, существенным недостатком этого сенсбилизатора является диапазон длин волн возбуждения, так как его максимум поглощения находится около 360 нм.

Кроме высокого квантового выхода 1O_2 и других активных форм кислорода фотосенсибилизаторы, ориентированные на использование для фотодинамической терапии опухолевых заболеваний, должны обладать низкой токсич-

ностью при отсутствии облучения [54], селективным накоплением в патологических тканях [55], должны выводиться из организма после терапии [56], возбуждаться на длине волны в области окна прозрачности тканей (650-1000 нм) и проникать через мембраны клеток [34].

К нетоксичным фотосенсибилизаторам второго поколения, имеющим более высокие степени накопления в патологических тканях и выведения из организма, можно отнести фотосенсибилизаторы на основе бензопорфирина (Vertiporfin, Visudyne) [57], тексафрина (Lutrin, Antrin, Optrin)[58], хлорина е6 (Фотодиазин, Радахлорин, Фотолон) [6], фталоцианина (Фотосенс)[59], бактериохлоринов (Tookad) и др. Широко используемыми в российской клинической практике являются препараты Фотодитазин, Фотолон, Радахлорин, пик полосы поглощения которых находится около 662 нм, и фотосенсибилизатор Фотосенс с максимумом поглощения около 676 нм. Квантовый выход синглетного кислорода для фотосенсибилизаторов на основе хлорина е6 достигает 0,7 в водных растворах [60], а для фталоцианинового ряда варьируется от 0,5 до 0,7 в зависимости от заместителя и иона металла (цинк, алюминий, кремний)[61].

Кроме лечения онкологических заболеваний, фотосенсибилизаторы используются для обеззараживания поверхностей [62], противовирусной [63] и противобактериальной терапии [64], а также в флуоресцентной диагностике [65], оценке концентрации генерируемого синглетного кислорода из анализа задержанной флуоресценции фотосенсибилизатора [66] и подборе дозы фотодинамического воздействия по динамике его фотообесцвечивания [67]. Поэтому чрезвычайно важно знать фотофизические свойства фотосенсибилизатора, в частности широко используемого в России препарата Радахлорин.

1.1.1 Фотосенсибилизатор хлоринового ряда Радахлорин

Фотосенсибилизатор второго поколения Радахлорин, производимый компанией ООО «РАДАФАРМА», широко используется в клинической практике в России и Республике Корея и проходит III фазу клинических испытаний в Европе для лечения различных заболеваний, например в гастроэнтерологии [3], гинекологии [4], дерматологии [5], а также в инактивации и ингибировании вирусов

[6; 7] и антимикробной терапии [8]. Показана возможность использования микрочастиц, содержащих Радахлорин, для доставки фотосенсибилизатора, повышения эффективности и избирательности фотодинамической терапии [68; 69]. Радахлорин является фотосенсибилизатором хлоринового ряда, в состав которого входит смесь активных солей: хлорин е6 (~80%), пурпурин 5 (~15%) и хлорин р6 (~5%), см рисунок 1.3.

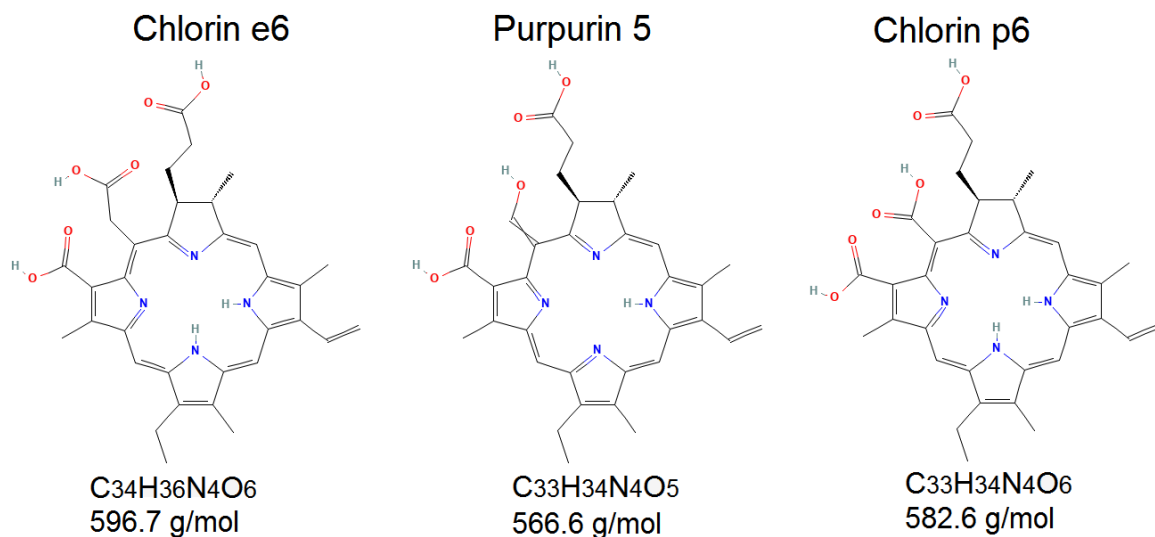


Рисунок 1.3 — Химические формулы и молярные массы солей, входящих в состав препарата Радахлорин

Несмотря на клиническое применение Радахлорина для фотодинамической терапии, повышение эффективности генерации активных форм кислорода, возможного использования ФС в фотодиагностике и дозиметрии представляет большой интерес, что требует углубленного исследования фотофизических свойств фотосенсибилизатора в различных условиях, например при разных уровнях кислотности и уровнях оксигенации растворов и клеток.

К настоящему моменту достаточно хорошо изучены основные свойства Радахлорина в растворах, в частности известны его спектры поглощения (300-800 нм) и флуоресценции (600-750 нм) для водных растворов ($pH \approx 6$) и растворов в фосфатном буфере ($pH \approx 7$), а также относительный квантовый выход флуоресценции в воде [16; 70; 71]. Фотосенсибилизатор Радахлорин в водном растворе имеет две широкие полосы в спектре поглощения с пиками на 405 нм и 660 нм, обусловленными поглощением порфириновым кольцом [17] (см. рис. 1.4).

Известно, что максимумы спектров поглощения и флуоресценции хлорина е6, основного компонента Радахлорина, сдвигаются в зависимости от кислотности

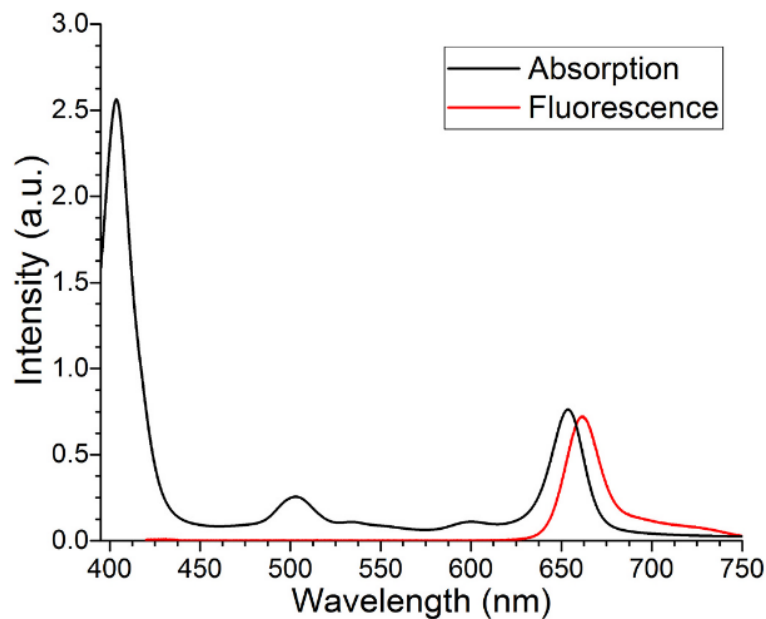


Рисунок 1.4 — Спектры поглощения и флуоресценции водного раствора фотосенсибилизатора Радахлорин [72]

сти растворителя из-за ионизации карбоксильных групп молекулы хлорина еб и протонирования атома азота в гетероцикле [17] (см. рисунок 1.5). Вместе с тем, в работе [17] также показано уменьшение интенсивности флуоресценции ФС с уменьшением уровня рН, стоит отметить, что аналогичные изменения наблюдались и для фотосенсибилизатора Радахлорин [19].

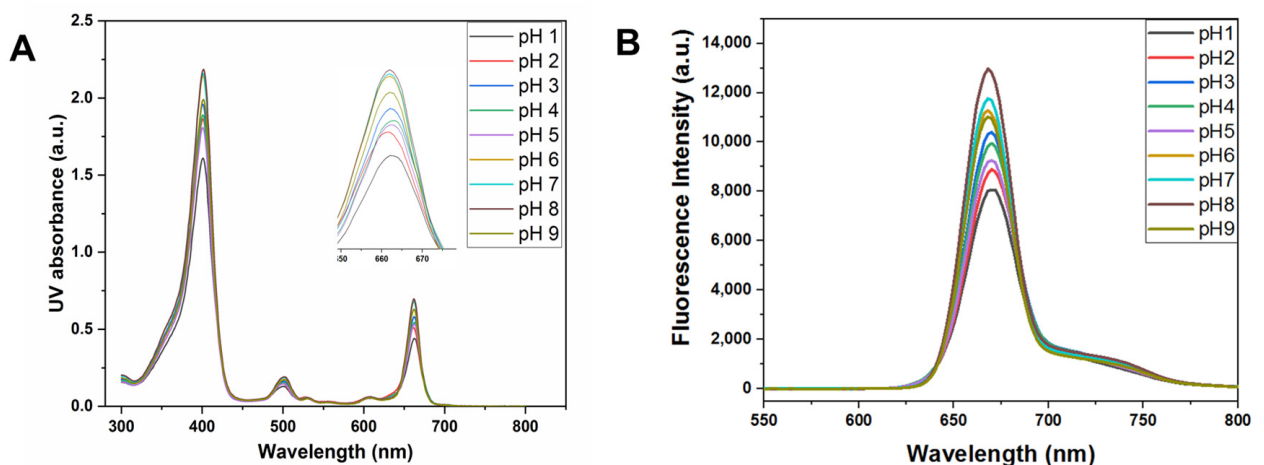


Рисунок 1.5 — Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) водного раствора хлорина еб [73]

Исследование фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода с помощью Радахлорина в работе [19] показало, что квантовый выход синглетного кислорода в водном растворе равен 0,52. Кроме того, эффективность

генерации синглетного кислорода быстро снижается при непрерывном облучении раствора Радахлорина в диапазоне длин волн 395–405 нм диодным лазером, что было продемонстрировано в работах [16; 74] при использовании химической ловушки синглетного кислорода L-триптофана. Снижение эффективности генерации синглетного кислорода в водных растворах Радахлорина может быть обусловлено фотохимическим изменением молекул фотосенсибилизатора при непрерывном облучении раствора.

1.2 Процессы фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизаторов

Процесс уменьшения интенсивности флуоресценции флуорофоров при облучении называется фотообесцвечиванием, включающим фотохимическое изменение красителя в ходе многочисленных циклов возбуждения-излучения, что приводит к его трансформации или разрушению и утрате его способности к флуоресценции. Необратимость процесса фотообесцвечивания красителей с низкой фотостабильностью является ключевой особенностью для флуоресцентных методов исследования диффузии, например для методов FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching - восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания) [75] и FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching - уменьшение флуоресценции при фотообесцвечивании) [76]. Во флуоресцентной микроскопии фотообесцвечивание обычно рассматривают как нежелательное явление, понижающее качество флуоресцентных изображений в ходе наблюдения за образцом [77]. Однако, явление фотообесцвечивания встречается не только во флуоресцентной микроскопии биологических образцов, например показана возможность эффективного использования селективного фотообесцвечивания для визуализации распространения поверхностных плазмонов поляритонов в металлических волноводах [78] и для записи информации в полимерах [79].

Механизмы фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов включают в себя фотодинамические процессы взаимодействия между возбужденными молекулами флуорофоров с растворенными молекулами кислорода в основном триплетном состоянии. В ходе возбуждения при большом квантовом выходе интеркомбинационного перехода большинство молекул ФС переходят из возбужденного

синглетного состояния S_1 в долгоживущее возбужденное триплетное состояние T_1 (для молекулы хлорина е6 в бескислородной среде время жизни триплетного состояния $\tau_{TO} \approx 200 \mu s$ [80]). Взаимодействие молекулы ФС в состоянии T_1 с молекулой O_2 может приводить в ходе реакций I и II типа к образованию, соответственно, активных форм кислорода и синглетного кислорода (см. рис 1.1), которые являются сильными окислителями и могут вызывать необратимые изменения и разрушение молекул фотосенсибилизатора при контакте с ними. В работе [81] продемонстрировано, что вынужденное истощение триплетного уровня T_1 флуорофора оптическим импульсом приводит к значительному уменьшению эффекта фотообесцвечивания. Вместе с тем, к увеличению фотостабильности флуорофоров приводит деоксигенация исследуемых растворов, что наблюдалось в работах [82; 83]. Стоит отметить, что не только активные формы кислорода, но и молекулярный кислород в основном состоянии участвует в реакциях фотообесцвечивания. Так, в работе [84] для производных фтора было показано, что кислород в основном состоянии играет важную роль в фотореакциях. Перечисленные реакции, лежащие в основе механизмов фотообесцвечивания, зависят как от концентрации активных форм кислорода, так и от расстояния между флуорофором и органическими молекулами, следовательно, количество излучаемых молекулой фотонов перед ее разрушением, зависит как от природы самой молекулы красителя, так и от ее микроокружения.

Деоксигенация и подавление интеркомбинационного перехода в триплетное состояние ФС в ряде случаев не позволяет избежать быстрого фотообесцвечивания при высокой интенсивности облучения, что объясняется фотоионизацией молекул, обычно наблюдаемой в полярных средах без кислорода и приводящей к образованию нефлуоресцирующих форм [85; 86]. Стоит отметить, что молекула флуорофора в возбужденном триплетном состоянии T_1 тоже является высокореакционной и может участвовать в необратимых реакциях с молекулами окружающей среды, например с белками или липидами [77]. При рассмотрении механизмов фотообесцвечивания необходимо упомянуть автокатализ процессов фотообесцвечивания, когда флуорофор в результате фотохимических реакций с органическими молекулами может переходить в реакционноспособные промежуточные продукты, вызывающие фотообесцвечивание других молекул, что приводит к увеличению скорости фотообесцвечивания. Например, фотоиндуцированный автокатализ наблюдался для красителей эритрозин и ксантен с

длинными временами жизни триплетного состояния при микромолярных и миллимолярных концентрациях соответственно [87]. В свою очередь, деоксигенация среды только способствует этому пути фотообесцвечивания, так как уменьшается вероятность тушения триплетного состояния молекулы флуорофора при взаимодействии с молекулой кислорода [82]. На скорость протекания фотообесцвечивания также влияют такие процессы, как агрегация молекул красителя и наличие тушителей активных форм кислорода или антиоксидантов [82].

Существуют разные подходы к исследованию процессов фотообесцвечивания ФС, большую часть которых можно разделить на две группы: изучение изменения свойств (1) поглощения и (2) флуоресценции растворов при их непрерывном облучении. Процессы фотообесцвечивания могут быть численно описаны несколькими путями:

- Вычисление эффективной константы k скорости фотообесцвечивания раствора из регистрируемой динамики интенсивности флуоресценции $F(t)$ при непрерывном облучении [88]

$$F(t) = F_0 e^{-kt} = \frac{g\Phi_f S_{1eq} c_0 V_{ill}}{\tau_0} e^{-kt}$$

где Φ_f - квантовый выход флуоресценции, g - параметр, определяющий эффективность регистрации сигнала флуоресценции, S_{1eq} - вероятность заселения уровня S_1 , c_0 - концентрация красителя, V_{ill} - излучаемый объем, τ_0 - время жизни флуоресценции. Однако, как было описано ранее, фотообесцвечивание часто не является одностадийным процессом и в ряде случаев не может быть описано одноэкспоненциальной функцией.

- Определением квантового выхода фотообесцвечивания Φ_b [89]:

$$\Phi_b = \frac{\Delta N}{\Delta Q}$$

где ΔN - количество фотообесцвеченных молекул, а ΔQ - количество поглощенных фотонов за одинаковый промежуток времени. Как было показано в работе [88] при рассмотрении системы, где процесс фотообесцвечивания молекулы происходит только с уровней S_1 и T_1 , и при малой мощности облучения кюветы с раствором, Φ_b можно выразить через k

как

$$\Phi_b = \frac{V_{sol}}{\sigma_{01} \gamma b_c} \cdot \frac{k}{P}$$

где V_{sol} - освещаемый объем кюветы, σ_{01} - сечение поглощения, γ - обратное значение энергии фотона, b_c - длина оптического пути, P - мощность возбуждающего излучения. С другой стороны, в ряде работ Φ_b определялся по свойствам поглощения растворов флуорофоров [90; 91].

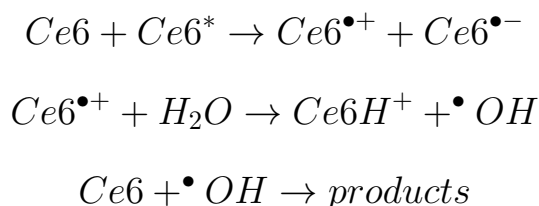
- Определением констант фотообесцвечивания при мультиэкспоненциальном фитировании динамики флуоресценции ФС при многоступенчатом процессе фотообесцвечивания [72].
- Измерением времени, за которое интенсивность сигнала флуоресценции уменьшается в два раза при непрерывном облучении раствора [92].
- Измерением количества энергии возбуждения (накачки), необходимого для уменьшения интенсивности флуоресценции в два раза [93].

1.2.1 Фотообесцвечивание фотосенсибилизаторов хлоринового ряда в водных и органических растворах

Фотодеградация фотосенсибилизаторов хлоринового ряда исследовалась ранее по изменению свойств флуоресценции и поглощения растворов хлорина еб. Так, по свойствам поглощения был определен квантовый выход фотообесцвечивания Φ_b растворов хлорина еб в PBS с концентрацией $5 \mu\text{ M}$, который оказался равным $1,9 \cdot 10^{-3}$ [90]. Вместе с тем, фотообесцвечивание растворов хлорина еб зависит от значения pH. В работе [91] было показано, что при концентрации хлорина еб $10 \mu\text{ M}$ в растворе с pH=4 $\Phi_b=0,8 \cdot 10^{-3}$, а при pH=7.8 $\Phi_b=0,5 \cdot 10^{-3}$. Стоит отметить, что на фотостабильность раствора хлорина еб и на степень изменения Φ_b влияет не только pH, но и полярность растворителя [91].

В фотообесцвечивании фотосенсибилизаторов хлоринового ряда синглетный кислород играет важную роль, однако деоксигинация раствора и использование эффективного тушителя гидроксильного радикала ($\bullet\text{OH}$) показало также вовлеченность $\bullet\text{OH}$ в фотообесцвечивание хлорина еб [94]. Кроме того, в

работе был предложен механизм фотообесвечивания деоксигенированных растворов с образованием радикалов:



Вместе с тем, исследование органических растворов в работе [91] показало, что Φ_b хлорина еб уменьшается при увеличении концентрации BSA (бычий сывороточный альбумин) как в водном растворе, так и в водном растворе с пониженной концентрацией кислорода, полученной за счет его насыщения аргонном (см. рисунок 1.6 (а)). Низкая фотостабильность несвязанного с белком хлорина еб объясняется авторами [91] умеренной эффективностью самотушения, при этом связь с альбумином (BSA) приводит к экранированию белком - не происходит окислительного повреждения с переносом электронов.

Исследования фотостабильности фотосенсибилизатора Радахлорин проводились в работах [95–98], где по изменению оптической плотности раствора при его непрерывном облучении в полосе Соре вычислялась динамика концентрации молекул фотосенсибилизатора (см рисунок 1.6 (b)), которая уменьшалась в два раза менее чем за 20 секунд непрерывного облучения. Относительно низкая фотостабильность фотосенсибилизаторов хлоринового ряда (Радахлорина и Фотодитазина) по сравнению с Димегином объяснялась низкой симметрией молекулы, нарушением симметрии электронного облака молекулы и, соответственно, снижением устойчивости к внешним воздействиям, в частности к синглетному кислороду.

Изменение интенсивности флуоресценции Радахлорина в водных растворах при различных условиях оксигенации исследовалось в работах [18; 99], где уменьшение концентрации растворенного кислорода с 15 мг/литр до 5 мг/литр не приводило к изменению кинетики флуоресценции Радахлорина, что объяснялось авторами превалярованием реакции фотодеградации молекулы фотосенсибилизатора (PS) с переносом электрона между триплетным состоянием молекулы фотосенсибилизатора (T_1) и растворенными молекулами кислорода $T_1 + {}^3 O_2 \rightarrow PS^+ + O_2^{\bullet-}$ над реакцией окисления с синглетным кислородом $S_0 + {}^1 O_2 \rightarrow PS^+ + O_2^{\bullet-}$.

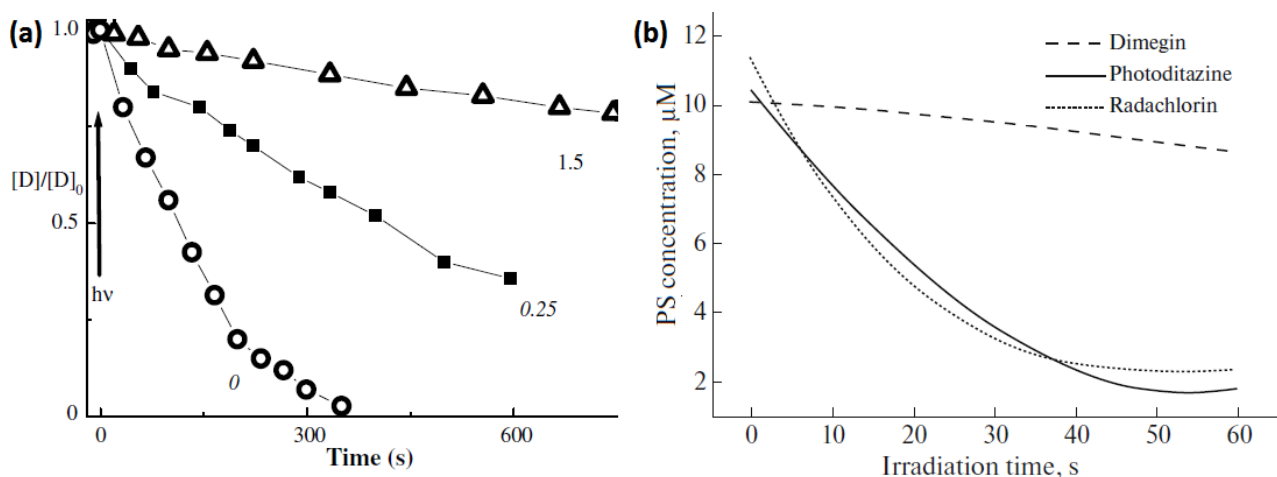


Рисунок 1.6 — (а) Динамика изменения поглощения насыщенного аргонном раствора хлорина еб на длине волны 405 нм в зависимости от времени облучения раствора при отношении количества молекул BSA к хлорину еб 0, 0,25 и 1,5 и при рН=7.8 [19]. (b) Зависимость концентрации фотосенсибилизатора в растворе буфера (рН = 7.0) от времени облучения светодиодной матрицей ($\lambda_m = 395\text{--}405$ нм) [97].

1.3 Применение время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для исследования процессов фотодинамического воздействия

Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия и микроскопия широко используются для исследования микроокружения молекул [100; 101] и молекулярных взаимодействий [102] в растворах, клетках и тканях, а также в клинической практике [103]. Время-разрешенные методы позволяют получать информацию о временах затухания (времени жизни) флуоресценции и константах скорости различных процессов в сложных системах. Время жизни флуоресценции флуорофора τ — это среднее время, которое молекула проводит в возбужденном состоянии S_1 (рис. 1.1), прежде чем вернуться в основное состояние S_0 в ходе излучательных и безызлучательных процессов:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.1)$$

где Γ и k_{nr} — константы скорости излучательных и безызлучательных процессов соответственно.

Время-разрешенные флуоресцентные методы обладают неоспоримым преимуществом по сравнению с флуоресцентными методами измерения интенсивности, так как время затухания флуоресценции является свойством флуорофоров и нечувствительно к изменению интенсивности возбуждения, рассеянию света в образце, изменению концентрации флуорофора, фотообесцвечиванию и фокусировке микроскопа [104]. Вместе с тем, изменение микроокружения может приводить к изменению скорости процессов безызлучательной релаксации k_{nr} и соответственно к измеряемому значению времени затухания флуоресценции τ . Таким образом, время затухания флуоресценции флуорофоров чувствительно к ряду параметров, например к температуре [105], pH [106], концентрации кислорода и концентрации тушителей возбужденных состояний молекулы флуорофора [104], полярности растворителя [107], а также к наличию в образце молекул, способных связываться с молекулами флуорофора и др. [104].

Существует два основных метода регистрации времени затухания флуоресценции: фазово-модуляционный метод (frequency-domain method) и импульсный метод с регистрацией время-разрешенного профиля затухания флуоресценции (time-domain method). Фазово-модуляционный метод измерения τ флуоресценции основан на модуляции (обычно синусоидальной с частотой модуляции ω) интенсивности возбуждающего света и регистрации интенсивности излучения, которое также модулировано и задерживается по времени относительно возбуждения из-за конечного времени затухания флуоресценции. В данном методе время затухания флуоресценции τ может быть рассчитано из сдвига фазы между модулированным возбуждающим светом и флуоресценцией Φ и коэффициента демодуляции регистрируемого сигнала M . Для одноэкспоненциального затухания сигнала флуоресценции флуорофора [108]:

$$\Phi = \arctan(\omega\tau)$$

$$M = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}}$$

Второй метод основан на возбуждении молекул коротким лазерным импульсом и регистрации временного профиля затухания интенсивности флуоресценции. Время-разрешенный профиль затухания флуоресценции может быть получен разными методами, например с помощью стробоскопического метода, где быстрый фотодетектор периодически регистрирует сигнал в течение

короткого времени при разной задержке относительно возбуждающего импульса, большое количество стробирующих импульсов позволяет численно получить полную кривую затухания флуоресценции во времени [109]. Метод успешно используется не только для спектроскопических [110], но и для микроскопических [111] клинических применений.

С другой стороны, профиль затухания флуоресценции после импульсного возбуждения может быть получен время-коррелированным методом счета единичных фотонов, который основан на регистрации единичных фотонов флуоресценции после импульсного возбуждения. При испускании возбуждающего импульса подается сигнал синхронизации на время-амплитудный преобразователь, где происходит линейное нарастание напряжения. Регистрация первого фотона флуоресценции, например с помощью лавинного фотодиода или фотоэлектронного умножителя, работающего в режиме счета фотонов, останавливает нарастание напряжения на время-амплитудном преобразователе, при этом временное разрешение данного метода может достигать нескольких пикосекунд. С помощью многоканального анализатора и повторяющихся циклов возбуждения и регистрации времени прихода первого фотона флуоресценции формируется гистограмма распределения числа фотонов от времени их регистрации после импульса возбуждения. Регистрируемая гистограмма распределения фотонов представляет собой свертку между временным профилем затухания флуоресценции ($F(t)$) и аппаратной функцией отклика ($IRF(t)$) [109]:

$$I(t) = F(t) \otimes IRF(t) = I_0 \int_0^t IRF(t') \sum_i A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad (1.2)$$

где τ_i - время жизни флуоресценции, A_i - предэкспоненциальные множители.

Основным методом анализа профилей затухания флуоресценции является подгонка экспериментальных сигналов экспоненциальными функциями 1.2. Однако в случае, когда необходимо проводить анализ большого количества сигналов, например в микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции (Fluorescence-lifetime imaging microscopy, FLIM), где в каждом пикселе регистрируется время-разрешенный сигнал, или при малом отношении сигнал/шум, что делает точную подгонку невозможным, анализ сигналов часто проводится с помощью phasor-plot (фазовые диаграммы). Представление экспериментальных

данных в графическом виде phasor-plot распространено при анализе FLIM-изображений, полученных как фазово-модуляционным методом (frequency-domain method), так при регистрации время-разрешенного профиля затухания флуоресценции (time-domain method), что существенно упрощает анализ несколько тысяч сигналов, зарегистрированных в каждом пикселе.

Построение фазовых диаграмм (phasor-plot) происходит при однозначном соответствии пикселя FLIM-изображения и точкой на графике с координатами S и G, определяемые как $G = M \cdot \cos(\Phi)$ и $S = M \cdot \sin(\Phi)$ для фазово-модуляционного метода, а при регистрации время-разрешенного профиля затухания флуоресценции как:

$$G = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (1.3)$$

$$S = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

где T- период, ω -частота повторения возбуждающего импульсного лазера. Одной из особенностей фазовых диаграмм (phasor-plot) является расположение точки на полуокружности, если регистрируемый сигнал является одноэкспоненциальным, при этом чем меньше время затухания флуоресценции тем правее на окружности находится точка (см. рисунок 1.7). Такой анализ широко используется при изучении смесей веществ с разными временами жизни флуоресценции, в этом случае точка на phasor-plot располагается на хорде, которая соединяет точки на полуокружности, соответствующие отдельным компонентам смеси. Такой подход широко используется для анализа сигналов флуоресценции, в частности для вычисления компонент связанного и несвязанного кофермента FAD[112; 113]. Также если в одном поле зрения находятся два флуорофора, перекрывающиеся по спектру, и для них известны координаты S и G на phasor-plot, тогда можно разделить области их флуоресценции в поле зрения выделяя нужные области фазовой диаграммы[114; 115]. Вместе с тем, такой подход используется для анализа микроокружения флуорофора при изменении пара-

метров флуоресценции[116]. Примеры пространственных распределений времен затухания фотосенсибилизатора Радахлорин в гистологических срезах тканей и соответствующие им фазовые диаграммы представлены на рисунке 1.7, где на phasor-plot хорошо видно изменение положение точек полей зрения для образцов, подвергшихся фотообесцвечиванию, относительно сигналов, полученных при изучении контрольных гистологических срезов.

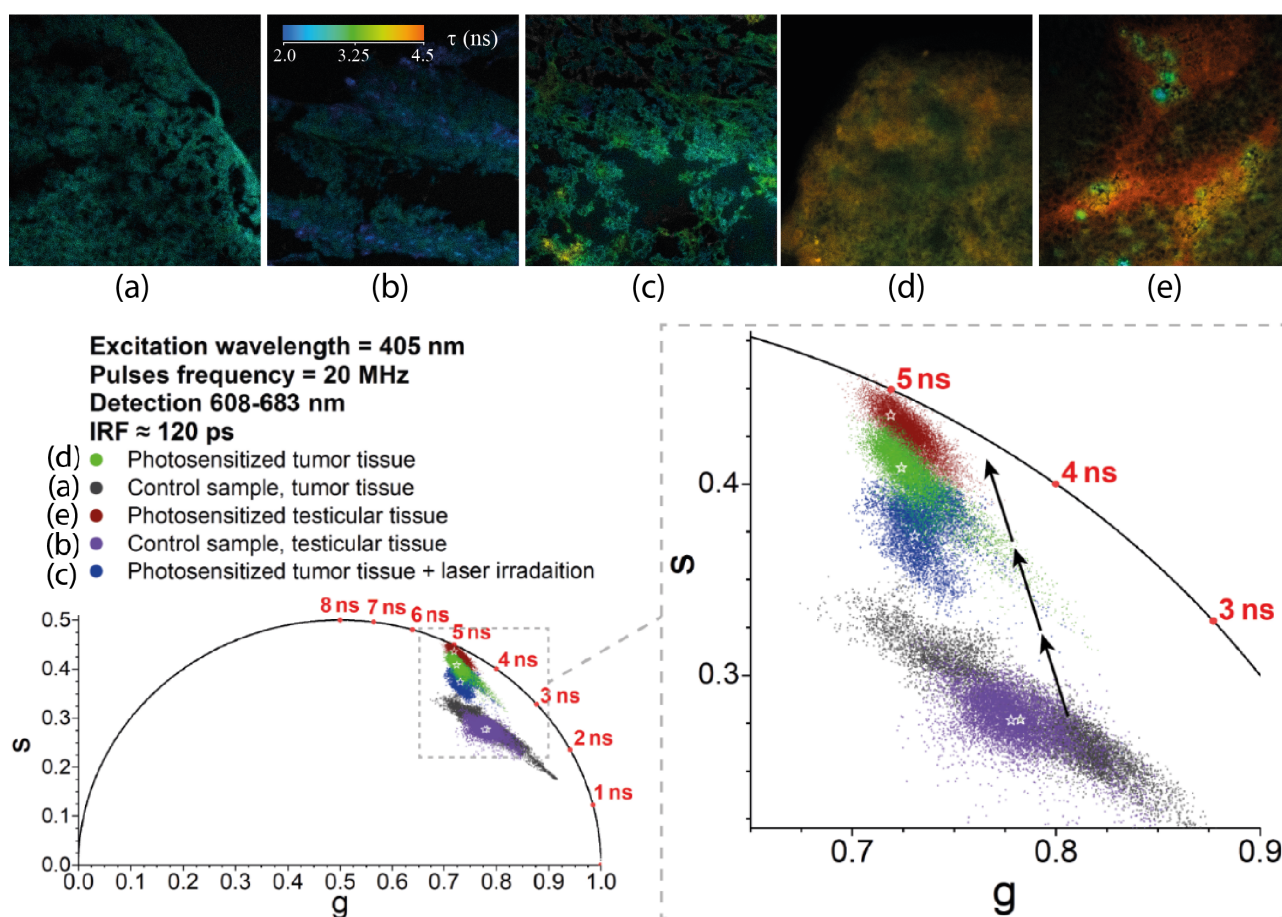


Рисунок 1.7 — Пространственные распределения времен затухания (FLIM-изображения) Радахлорина в разных тканях (а-е). Внизу: phasor-plot для представленных FLIM-изображений, представленные разными соответствующими цветами [117].

Кроме регистрации профиля затухания флуоресценции, большой интерес представляет анизотропия флуоресценции, которая позволяет получить информацию о размере и форме молекулы [118] или о свойствах микроокружения, например о локальной вязкости [119]. Измерения анизотропии основаны на принципе фотоселективного возбуждения молекул флуорофоров поляризованным светом. В изотропном растворе возбуждаются преимущественно молекулы, дипольные моменты перехода которых ориентированы вдоль направления

электрического вектора возбуждения. Поскольку дипольный момент перехода имеет определенную ориентацию относительно главных осей молекулы, то наблюдается ориентация молекул в возбужденном состоянии. Такое избирательное возбуждение приводит к частичной поляризации флуоресценции, степень которой характеризуется параметром анизотропии. Относительный угол между векторами дипольного момента поглощения и флуоресценции определяет анизотропию в начальный момент времени. Анизотропия флуоресценции (r) определяется как [120]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} - параллельная и перпендикулярная к направлению поляризации возбуждающего излучения компоненты поляризованной флуоресценции при возбуждении линейно поляризованным излучением.

Анизотропия флуоресценции может затухать в течение времени жизни возбужденного состояния за счет взаимодействия с окружающей средой, например в ходе вращательной диффузии. Предполагая, что никакие другие процессы кроме вращательной диффузии не приводят к изменению анизотропии, ожидаемая временная зависимость анизотропии определяется как [121]:

$$r(t) = r_0 e^{-\frac{t}{\tau_{rot}}}$$

где r_0 - начальная анизотропия флуоресценции (анизотропия флуоресценции в момент возбуждения), τ_{rot} - время вращательной диффузии. В свою очередь, время вращательной диффузии задается выражением Стокса-Энштейна:

$$\tau_{rot} = fC \frac{\theta V}{kT}$$

где k и T - постоянная Больцмана и температура соответственно, V - Ван-дер-Ваальсов объем молекул растворенного вещества, θ - макроскопическая вязкость растворителя, f - коэффициент, характеризующий форму молекул растворенного вещества, C - коэффициент, обозначающий трение между растворенным веществом и растворителем. Таким образом, измеряя время вращательной диффузии по временной зависимости анизотропии можно получить информацию о локальной вязкости [122] и о процессах связывания флуорофора с другими крупными молекулами [123].

Исследование фотосенсибилизаторов время-разрешенными методами в растворах и клетках проводилось в ряде работ [124–126]. На времена жизни флуоресценции фотосенсибилизаторов, как известно, может влиять растворитель, так время-разрешенные профили флуоресценции фотосенсибилизаторов хлоринового ряда ранее исследовались в водных и спиртовых растворах, в которых времена жизни флуоресценции молекулы хлорина еб составляли 4,4 нс и 3,7 нс в этаноле и в фосфатном буфере (рН=7,4) соответственно [127].

Кроме того, ряд фотосенсибилизаторов имеет тенденцию к агрегации. В растворах метанола время жизни флуоресценции мономера хлорина еб составляет 4,5 нс, при этом хлорин еб подвержен агрегированию, что приводит к существенному уменьшению времени жизни флуоресценции до 0,5 нс в растворах метанола [109]. Вместе с тем, для фотосенсибилизатора mTHPC было показано, что при внутриклеточной агрегации молекул происходит не только уменьшение времени жизни флуоресценции, но и уменьшение эффективности фотодинамического воздействия на живые клетки в связи с самотушением триплетного уровня молекул ФС при агрегации [128].

В ходе фотодинамического воздействия могут образовываться побочные фотопродукты, которые меняют микроокружение молекул ФС и соответственно влияют на процессы безызлучательной релаксации молекул. Например, для производной гематопорфирина (HpD) показано, что длительное облучение может привести к появлению короткой компоненты в профиле затухания флуоресценции [124]. Исследования *in vivo* показали увеличение интенсивности короткоживущей компоненты флуоресценции ($1,0 \pm 0,3$ нс) при повышении интенсивности возбуждения, что может быть объяснено образованием фотопродуктов в результате фотообесцвечивания мономеров HpD [124].

Фотопродукты и агрегаты могут приводить к изменению спектров флуоресценции, времени жизни флуоресценции и фототоксичности. Время-разрешенные флуоресцентные методы со спектральным разрешением позволили исследовать мономерные и агрегированные формы фотосенсибилизатора Фотофрин, а также изучить изменение митохондриального метаболизма клеток в ходе фотодинамического воздействия с Фотофрином при регистрации автофлуоресценции [129].

Другим аспектом, влияющим на параметры флуоресценции фотосенсибилизаторов, является возможность связывания с органическими соединениями

в биологических системах. Так, исследование время-разрешенной флуоресценции хлорина е6 при взаимодействии с агентом, алкилирующим ДНК, показали уменьшение времени жизни флуоресценции как в водном растворе так и в мицеллярных системах, которые используются как биологические модели клеточных мембран [130].

1.4 Применение методов фазовой визуализации для исследования биологических объектов

Для всестороннего исследования процессов фотодинамического воздействия, кроме изучения фотофизических свойств фотосенсибилизаторов и процессов генерации активных форм кислорода, необходимо изучать клеточный отклик *in vitro* и *in vivo*. В последние годы все больше внимания уделяется разработке и совершенствованию малоинвазивных методов анализа биологических объектов, в частности оптических методов, основанных на регистрации изменений фазы излучения, проходящего через биологические структуры, - методов количественной фазовой визуализации (QPI) [131]. К настоящему моменту существует множество методов получения пространственного распределения фазового запаздывания, индуцированного образцом в проходящий волновой фронт, например, к таким методам можно отнести внеосевую и осевую когерентную голографическую микроскопию и томографию, которые основаны на регистрации интерференционных картин, численную фазово-контрастную микроскопию, реализуемую за счет введения в оптический путь фазово-контрастного микроскопа пространственного модулятора света, а также метод основанный на вычислении фазового запаздывания волнового фронта из серии дефокусированных распределений интенсивностей в ходе решения уравнения переноса интенсивности света (TIE, transport of intensity equation) [132].

Отличительной особенностью методов фазовой визуализации является отсутствие требования на введение внутриклеточных маркеров и возможность использования излучения низкой плотности мощности порядка 50-100 мкВт/см² [133; 134] для когерентной голографической микроскопии в плоскости образца, что позволяет минимизировать влияние метода исследования при изучении ре-

акции объекта на внешнее воздействие. Различные модификации этих методов позволяют использовать как когерентное [135], так и низкокогерентное излучение [136] и восстанавливать форму поверхности, распределения интегрального фазового набегга, трехмерные распределения показателя преломления, получать информацию о дисперсии показателя преломления и т.д [137; 138].

Одним из методов фазовой визуализации является метод внеосевой цифровой голографической микроскопии, основанный на регистрации интерференционной картины двух волн: опорной и предметной, прошедшей через исследуемый образец. Восстановление пространственного распределения фазового запаздывания, индуцированного образцом, из регистрируемой интерференционной картины возможно разными методами. Например, алгоритм, предложенный Томасом Крайсом, позволяет восстанавливать информацию о фазе предметной волны из единственной внеосевой цифровой голограммы [139; 140]. В его основе лежит двойное применение Фурье-преобразования с фильтрацией в частотном пространстве первого дифракционного порядка, что приводит к уменьшению пространственного разрешения восстанавливаемого изображения. Существуют и другие методы, позволяющие восстанавливать фазовое изображение из единственной интерференционной картины, например алгоритм, предложенный в работе [141], однако они также уменьшают пространственное разрешение восстанавливаемого фазового изображения. С другой стороны, метод фазовых шагов позволяет полностью сохранить пространственное разрешение оптической системы, но требует регистрации нескольких интерференционных картин со сдвигом фазы в опорном плече системы [142], что мало применимо для исследования быстро протекающих процессов. В свою очередь, существуют методы повышения пространственного разрешения фазового изображения клеток. Так, голографическая томография и цифровая голографическая микроскопия с использованием синтетической апертуры позволяют повысить пространственное разрешение фазового изображения, однако требуют регистрации большего количества данных, вращения зондирующего пучка или объекта [143].

Вне зависимости от метода восстановления пространственного распределения фазового запаздывания $\Delta\phi(x,y)$, индуцированного клетками, последующий анализ изображения позволяет определить ряд важных морфологических и оптических параметров биологических объектов. При голографическом мониторинге клеток широко применяются параметры, усредненные по площади

клетки S , такие как суммарный $\Delta\Phi = \int_S \Delta\phi(x,y)dxdy$ и средний $\Delta\phi_{av} = \frac{\Delta\Phi}{S}$ по площади проекции S фазовый набег, внесенный клеточными структурами в прошедший волновой фронт. Кроме того, при голографическом мониторинге живых клеток, например при делении клеток [144], часто рассматривают массу сухого вещества клеток DM :

$$DM = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \int_S \Delta\phi(x,y)dxdy \quad (1.4)$$

где α - параметр, определяющий отношение показателя преломления внутриклеточных белков к их массе на 100 мл. Для большинства типов клеток α колеблется в пределах 0,0018–0,0021 м³/кг со средним значением около 0,0019 м³/кг [145]. Вместе с тем, в ряде процессов меняются геометрические параметры клеток при неизменной массе сухого вещества DM , что приводит к изменению плотности сухой массы $\sigma = \frac{DM}{S}$. При известном показателе преломления среды n_{med} , в которой находится живая или фиксированная клетка, и ее среднем показателе преломления n_{cell}^{av} , можно получить распределение толщины клетки $h(x,y) = \frac{\lambda}{2\pi}(n_{cell}^{av} - n_{med}) \cdot \varphi(x,y)$, её объем $V_{cell} = \int_S h(x,y)dxdy$, и площадь поверхности:

$$SA = \int_S \sqrt{1 + \left(\frac{\delta h(x,y)}{\delta x}\right)^2 + \left(\frac{\delta h(x,y)}{\delta y}\right)^2} dxdy + S$$

Кроме того, в ряде работ [146; 147] в ходе фазового мониторинга клеток вычислялся геометрический параметр - индекс сферичности клетки ψ , определенный как отношение площади поверхности сферы объемом V_{cell} к площади поверхности клетки SA . Вместе с тем, для полного описания отдельных клеток принято использовать не только параметры, характеризующие клетку в целом, но и статистические параметры распределения фазового запаздывания внутри клетки, такие как: дисперсия, коэффициенты эксцесса и асимметрии [147].

Методы фазовой визуализации, например внеосевая цифровая голографическая микроскопия и томография, широко используются в лабораторных исследованиях для определения параметров клеточных структур и их динамики в ходе внешнего воздействия [132; 134]. В частности, когерентная цифровая

голографическая микроскопия применяется для исследования биологических объектов и может использоваться в медицинской диагностике [21]. Этот метод был в частности использован для малоинвазивного исследования морфологии и ее динамики для клеток крови [148], эндотелиальных клеток [149], нейронов [150], бактериальной инфекции [151], гистологических срезов тканей [152], культур раковых клеток [153] и их динамики в ответ на противоопухолевую терапию [154]. Была продемонстрирована возможность определения не только морфологических параметров клеток, но и их сухой массы [135], метастатического потенциала [155] и типа клеточной гибели при внешнем воздействии [135].

Важно отметить, что методы цифровой голографической микроскопии позволяют осуществлять мониторинг живых клеток в динамике в течение длительного времени. В частности, несколько исследовательских групп занимались мониторингом *in vitro* отдельных живых клеток и их реакцией на внешние воздействия, включая химиотерапию В-клеточной лимфомы [156], электропорацию клеток [157], воздействие цитопатического агента [158]. На основе внеосевого голографического микроскопа был предложен неинвазивный метод точной цитометрии [159].

Исследования отклика клеток на фотодинамическое воздействие (ФДВ) с фотосенсибилизатором Радахлорин проводились ранее с использованием методов цифровой голографической микроскопии, где было показано [134; 135; 160], что метод цифровой голографической микроскопии позволяет численно оценить скорость протекания внутриклеточных процессов благодаря анализу динамики сухой массы и среднего фазового набега, внесенного клеткой. В работе [160] была показана возможность наблюдения клеточных процессов с помощью голографической томографии, позволяющей получить данные о трехмерном распределении показателя преломления в клетке. Голографические методы мониторинга клеток при ФДВ с Радахлорином показали существенно разную динамику клеточных параметров в зависимости от дозы облучения. Было показано, что при разных дозах могут реализовываться разные механизмы гибели клеток, приводящие к разным сценариям изменения их сухой массы и среднего фазового набега (см. рис. 1.8).

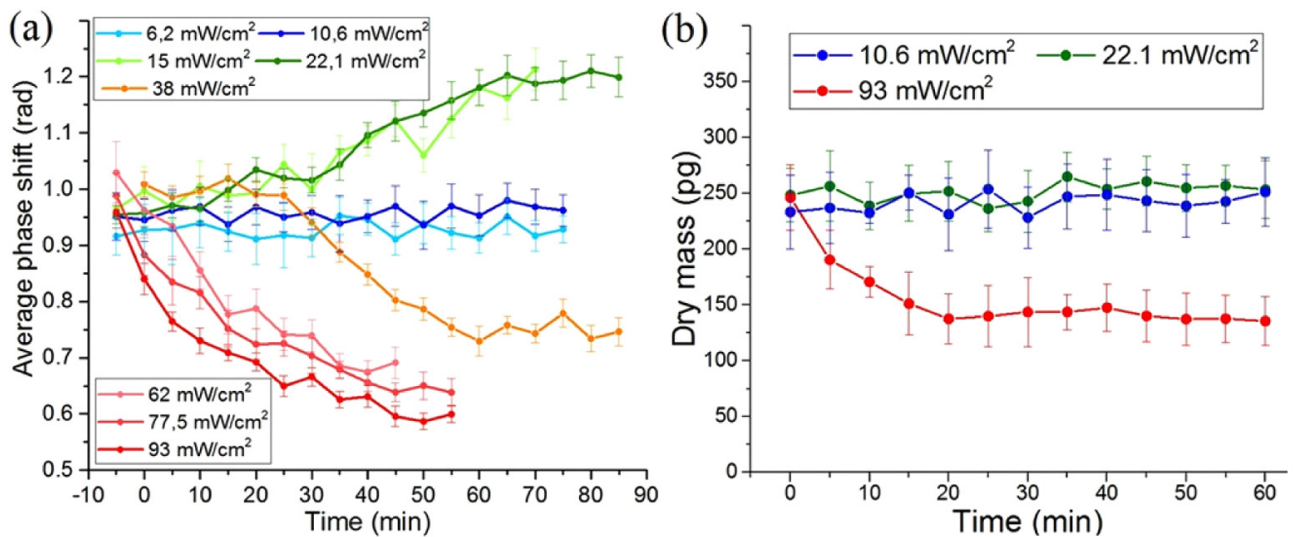


Рисунок 1.8 — Динамика среднего фазового набега (а) и сухой массы (б) клеток линии HeLa в ходе фотодинамического воздействия с Радахлорином при разных дозах облучения [135].

1.4.1 Современное состояние автоматизации голографического мониторинга и классификации фазовых объектов

Различие в динамике среднего фазового набега и сухой массы клеток при фотодинамическом воздействии с Радахлорином позволяет сделать вывод о возможности определения состояния клеток в ходе ФДВ на основе данных, полученных голографическими методами. На сколько известно, автоматизация определения состояния клеток при ФДВ по их параметрам, полученным с помощью голографической микроскопии, ранее не проводилась. Однако, в настоящее время машинное обучение успешно применяется для обработки восстановленных амплитудных и фазовых распределений в области цифровой голографии. В научной литературе представлен ряд статей, посвященных решению проблем автофокусировки [161], увеличения глубины резкости изображения, полученных голографическими методами [162], или оценки качества фокусировки изображений, что позволяет выбрать изображение наилучшего качества, а также рассчитать расстояние между плоскостями изображения и объекта [163]. Кроме того, методы машинного обучения могут быть использованы для решения широко распространенных задач, например, для компенсации оптических aberrаций [164] или для увеличения пространственного разрешения при автоматическом сшивании набора голографических данных с синтетической апертурой [165]. В

цифровой голографии машинное обучение используется также для обработки изображений и вычисления параметров клеток, в частности для сегментации клеток на их фазовых распределениях [166].

Кроме автоматизации голографического мониторинга и обработки данных методы машинного обучения широко используются для анализа клеточных параметров и классификации клеток. Голографический мониторинг применялся для отслеживания траекторий отдельных сперматозоидов в большом объеме ≈ 18 мкл с глубиной резкости $\approx 0,6$ мм [167]. Применение алгоритма машинной классификации (метода опорных векторов) для анализа подвижности сперматозоидов, их морфологических и оптических параметров, полученных голографическим методом, позволило разделить клетки в нормальном состоянии и подверженные окислительному стрессу с точностью ≈ 90 % [168]. Вместе с тем, применение метода опорных векторов на основе голографических данных позволило разделять клетки разной морфологии с большей точностью по сравнению с данными оптической микроскопии [133]. В работе [169] было показано, что диагностика малярии возможна при комбинации методов машинной классификации и осевого голографического мониторинга параметров клеток крови с точностью классификации более 95%. Показана возможность автоматизированного разделения трех типов клеток крови при использовании внеосевого голографического микроскопа и анализа 14 оптических и морфологических параметров клеток [170].

Сравнение точности различных алгоритмов автоматической классификации (метода опорных векторов, построения дерева решений, k-ближайших соседей и др.) при исследовании клеток в питательной среде и в натрий-фосфатном буфере (PBS), инициирующем изменение морфологии клеток, с помощью голографической микроскопии было проведено в работе [171], где продемонстрировано, что дополнение морфологических параметров, таких как площадь проекции и периметр площади прикрепления клетки, оптическими параметрами, полученными с помощью голографии, повышает точность классификации объектов для всех используемых алгоритмов. Однако, несмотря на широкое распространение алгоритмов машинного обучения для классификации фазовых объектов при их исследовании методами фазовой визуализации разработка алгоритмов автоматического определения отклика фотосенсибилизированных

клеток на внешнее фотодинамическое воздействие на основе голографических данных ранее не проводилась.

Глава 2. Исследование время-разрешенных сигналов флуоресценции синглетного кислорода и процессов фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизатора Радахлорин при напылении их на органические поверхности струей аэрозоля

Фотосенсибилизированная генерация синглетного кислорода (СК), наряду с другими активными формами кислорода, лежит в основе фотодинамической терапии (ФДТ), инактивации бактерий и вирусов, что широко используется в настоящее время, как было подробно описано в разделе 1.1. Несмотря на большое количество исследований время-разрешенных сигналов флуоресценции синглетного кислорода в растворах, в биологических системах основным методом детектирования активных форм кислорода являются флуоресцентные маркеры. Исследование же процессов фотообесцвечивания ФС, в частности Радахлорина (см. раздел 1.1.1), в основном также проводилось лишь в водных и органических растворах, что подробно рассмотрено в разделе 1.2.1. При этом, для оценки дозы фотодинамического воздействия может быть использованы измерения времен жизни и генерации синглетного кислорода, а также скорости фотообесцвечивания ФС [14; 15], что определяет актуальность исследований этих процессов в биологических системах.

В свою очередь, распыление фотосенсибилизаторов является эффективным методом их доставки в дыхательные пути [172; 173]. Вместе с этим постоянное обновление раствора ФС может позволить прямое детектирование сигнала флуоресценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм в модельной системе биологических объектов при использовании аэрозоли. Несмотря на применение аэрозоля как метода доставки, процессы генерации синглетного кислорода и фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов хлоринового ряда при напылении на органические поверхности, насколько известно автору, не были представлены ранее в научной литературе.

2.1 Исследование люминесценции синглетного кислорода в струе аэрозоля фотосенсибилизатора Радахлорин при разных условиях оксигенации раствора

До проведения экспериментов, направленных на исследование сигнала флуоресценции синглетного кислорода, генерируемого на поверхностях, были проведены работы по визуализации пространственного распределения интенсивности сигнала флуоресценции фотосенсибилизатора и регистрации интенсивности фосфоресценции СК в струе аэрозоля Радахлорина. Кроме того, был получен спектр люминесценции в диапазоне 1250 - 1300 нм при возбуждении молекул ФС в аэрозоле, для подтверждения того, что регистрируемый сигнал является именно сигналом фосфоресценции СК. Пространственное распределение флуоресценции фотосенсибилизатора часто используется как косвенный метод определения и визуализации пространственного распределения СК и широко применяется для фотодинамической диагностики и интраоперационного определения границ опухолей [174; 175]. Применяемый в работе метод прямого детектирования СК, основанный на регистрации сигнала люминесценции в области пика его фосфоресценции, хорошо известен и широко используется в научных исследованиях (раздел 1.1).

Схема экспериментальной установки, используемой для регистрации интенсивностей флуоресценции ФС и фосфоресценции СК в струе аэрозоля Радахлорина, представлена на рисунке 2.1. Струя раствора фотосенсибилизатора облучалась возбуждающим лазером, люминесценция СК фокусировалась линзой на входную щель монохроматора и регистрировалась фотоэлектронным умножителем (ФЭУ), а пространственное распределение интенсивности флуоресценции ФС регистрировалось на матрице цифровой камеры.

Струя аэрозоля формировалась с помощью компрессорного небулайзера для аэрозольной терапии Airbox nebulizer mod. C1 (MED2000, Италия), создающего непрерывную струю аэрозоля за счет высокоскоростного потока газа через раствор фотосенсибилизатора. Скорость потока газа через небулайзер для формирования струи аэрозоля был экспериментально оценен как ≈ 5 л в минуту, в то время как расход раствора ФС варьировался от 0,12 до 0,15 мл в минуту и зависел от размера образующихся капель, находящегося в диапазоне от 5 до 10

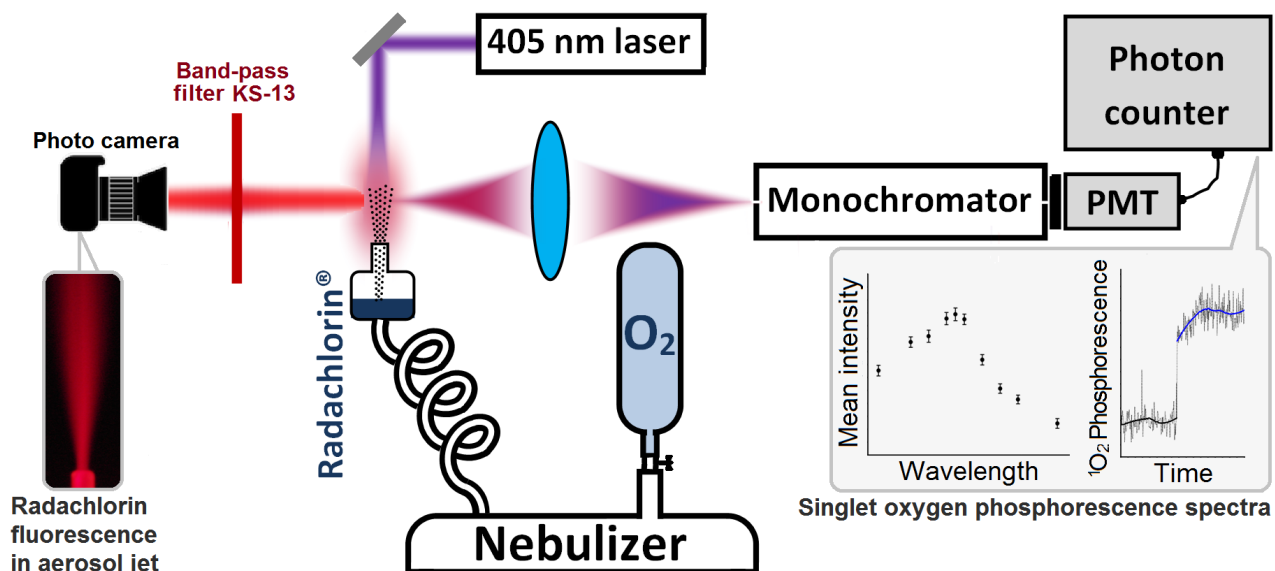


Рисунок 2.1 — Схема экспериментальной установки для регистрации интенсивностей фосфоресценции синглетного кислорода и флуоресценции Радахлорина в струе аэрозоля раствора фотосенсибилизатора

мкм. Экспериментальное исследование слабых сигналов фосфоресценции СК, генерируемого в мелкодисперсной структуре струи аэрозоля, затруднено из-за рассеяния возбуждающего и регистрируемого излучений, что привело к необходимости повышения локальной концентрации фотосенсибилизатора за счет выбора сопла, формирующего струю. Конструкция небулайзера позволила провести небольшую модификацию, где в канал забора газа подключалась подушка с кислородом, что позволило генерировать капли аэрозоля ФС, используя чистый кислород, и таким образом варьировать концентрацию кислорода. Давление кислорода в подушке контролировалось и поддерживалось таким, чтобы расход газа и раствора ФС при формировании аэрозоля чистым кислородом не отклонялся более чем на 5% от условий экспериментов, проводимых при использовании атмосферного воздуха. Для формирования аэрозоля использовался водный раствор Радахлорина с концентрацией активных солей 0,7 мг/мл ($\approx 1,1$ мМ), при этом концентрация ФС в объеме аэрозоля была значительно ниже и была оценена как $\approx 2 \cdot 10^{-5}$ мг/мл.

Возбуждение ФС Радахлорин возможно в широком диапазоне длин волн (см. рис. 1.4), в частности в клинической практике обычно применяются красные светодиодные матрицы, излучающие в пределах Q-полосы поглощения, которая имеет максимум около 660 нм, что соответствует "окну прозрачности тканей" и позволяет возбуждающему свету проникать вглубь образований [176].

Однако, при облучении фотосенсибилизатора на поверхности более эффективное возбуждение молекул ФС может быть достигнуто при возбуждении в области полосы поглощения Core с максимумом на длине волны 405 нм (рис. 1.4). Таким образом, для возбуждения молекул Радахлорина в данной части работы использовался непрерывный лазер с длиной волны 405 нм и относительно высокой плотностью мощности 2,2 Вт/см².

Применяемая методика исследования может быть выполнена с временным разрешением сигнала флуоресценции СК на длине волны около 1270 нм, что является информативным путем получения параметров сигнала флуоресценции СК [177]. Однако, измерения с временным разрешением оказались невозможны из-за низких концентраций молекул как ФС, так и СК в единице объема струи аэрозоля. Поэтому, в потоке капель раствора ФС проводилась только регистрация интенсивности флуоресценции СК ФЭУ NIR PMT (H10330B-45, Hamamatsu), чувствительным в спектральном диапазоне 900-1400 нм и работающим в режиме счета фотонов. Спектральный диапазон регистрируемого излучения выделялся с помощью монохроматора MDR-12 (ЛОМО, Россия) с обратной дисперсией 4,8 нм/мм, в котором входная и выходная щели были раскрыты на 2 мм, что обеспечивало спектральное разрешение 9,6 нм. Дополнительно перед ФЭУ устанавливалась кремниевая пластинка, отсекающая внешний шум в оптическом диапазоне длин волн.

Вначале, было визуализировано пространственное распределение интенсивности флуоресценции Радахлорина в струе аэрозоля (рис. 2.2 (а)). Как известно, полоса флуоресценции Радахлорина, соответствующая переходу из первого синглетного состояния S_1 в основное S_0 , имеет максимум примерно на 663 нм (см. рис. 1.4). Для регистрации интенсивности сигнала флуоресценции в экспериментальной установке использовалась CCD-камера Nx1000 (Samsung), обеспечивающая относительно длительное время экспозиции, и оптический фильтр КС-13 (600-2500 нм, ЛенЗОС, Россия) для отсекающего лазерного излучения, рассеянного каплями аэрозоля (рис. 2.1).

В отличие от стационарной схемы детектирования флуоресценции ФС в кювете [99], регистрация сигнала в струе аэрозоля не сопровождалась фотообесцвечиванием раствора за счет непрерывного обновления молекул ФС в наблюдаемом объеме, что позволило получить стабильные сигналы интенсивности

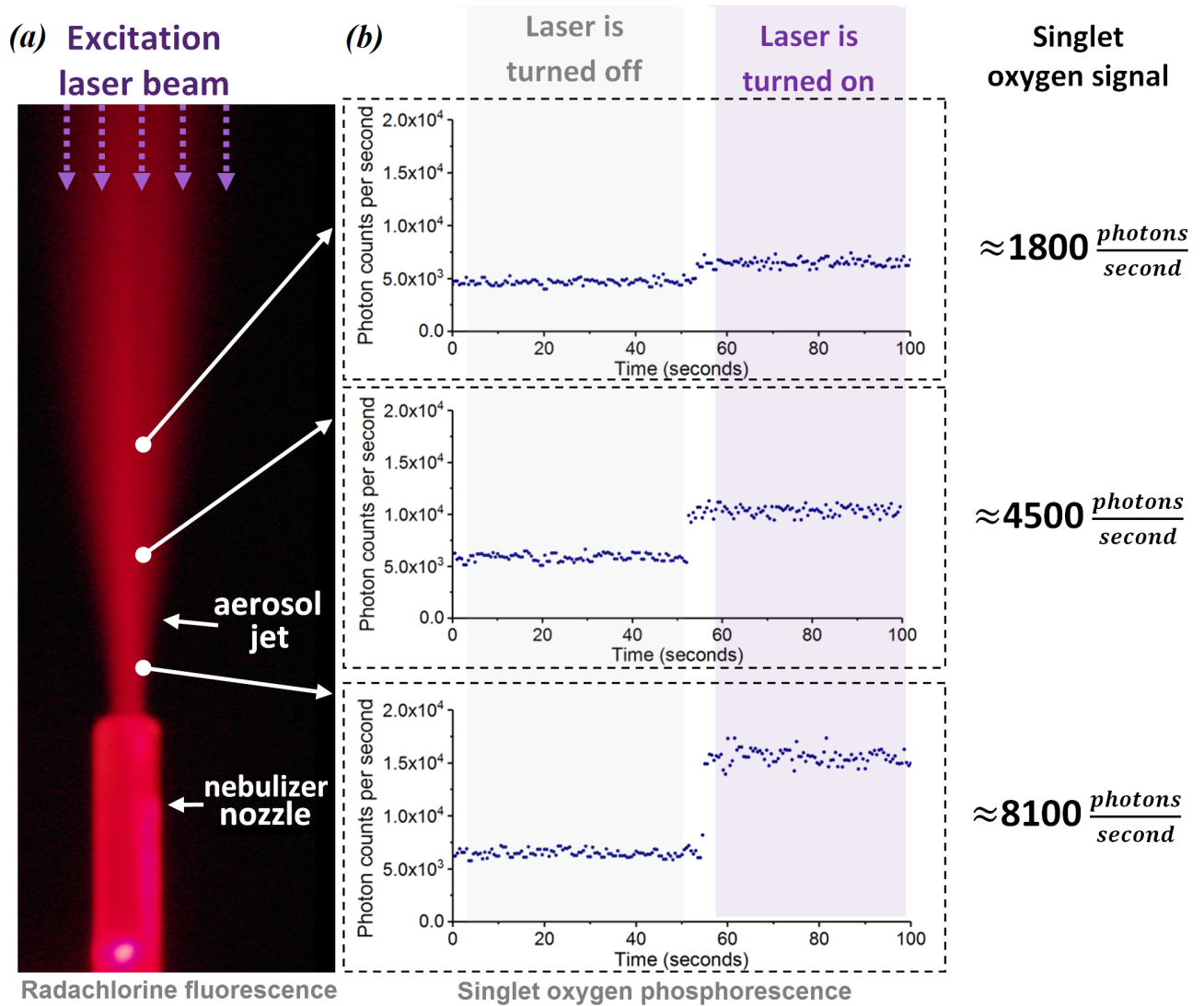


Рисунок 2.2 — (а) Пространственное распределение интенсивности флуоресценции ФС в струе аэрозоля раствора Радахлорина при возбуждении лазером на длине волны 405 нм. Возбуждающий лазерный луч направлен противоположно направлению распространения струи. (б) Количество фотонов сигнала фосфоресценции синглетного кислорода в спектральном диапазоне 1269-1279 нм в соответствующих областях, обозначенных белыми кружками на рисунке (а), при выключенном (от 0 до 55 сек) и включенном (от 55 до 100 сек) возбуждающем непрерывном лазере.

флуоресценции ФС. Флуоресцентное изображение пространственного распределения ФС в струе аэрозоля показано на рис. 2.2 (а).

Регистрация интегрального сигнала фосфоресценции СК в спектральном диапазоне 1269-1279 нм, выделяемого монохроматором, была проведена в нескольких местах струи аэрозоля при непрерывном облучении лазером с длиной волны 405 нм. Типичные сигналы фосфоресценции СК, полученные из

областей, расположенных на разных расстояниях от сопла небулайзера, показаны на рис. 2.2 (b). В диапазоне от 0 до 55 с показан сигнал, обусловленный темновым током ФЭУ и другими шумами, включение непрерывного лазерного возбуждения приводило (начиная с 55 сек) к регистрации устойчивого сигнала фосфоресценции СК. Как видно на рис. 2.2 (b), превышение регистрируемого сигнала фосфоресценции СК над шумом (количество фотонов в секунду указано на рисунке) уменьшается с увеличением расстояния от сопла небулайзера. Таким образом, концентрация синглетного кислорода уменьшалась при удалении от сопла небулайзера, что было связано с расширением диаметра струи при условии постоянного объема детектирования (фокального объема, собираемого линзой на катоде ФЭУ). Стоит отметить, что изменение расстояния между объемом регистрации сигнала и соплом может привести к варьированию эффективности детектирования фосфоресценции СК из-за разных условий рассеяния и поглощения света. Однако результаты экспериментов показали, что эффективность регистрации сигнала фосфоресценции СК снижалась всего лишь на 3-5 % с увеличением расстояния между соплом и фокальным объемом регистрации. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое снижение интенсивности сигнала фосфоресценции в первую очередь связано со снижением концентрации СК, вызванного расширением струи и уменьшением концентрации ФС в объеме аэрозоля.

Для подтверждения того, что полученный сигнал в диапазоне 1269-1279 нм (рис. 2.2 (b)) обусловлен именно фосфоресценцией СК, была исследована спектральная зависимость интенсивности сигнала люминесценции в струе сразу на выходе из сопла небулайзера. Схема установки, используемой для регистрации спектра люминесценции, представлена на рисунке 2.1. Для каждой длины волны, выделяемой монохроматором, вначале определялся уровень шума - сигнал на катоде ФЭУ без возбуждения молекул ФС, после чего включался непрерывный возбуждающий лазер и проводилась регистрация сигнала люминесценции (см. вставки на рис. 2.3, где от 0 до 60 с прописан уровень шума), что позволило рассчитать среднюю интенсивность фосфоресценции СК в определенном спектральном диапазоне. На рис. 2.3 представлен спектр люминесценции в струе аэрозоля ФС в диапазоне 1250-1300 нм. Полученный спектр имеет типичный пик фосфоресценции СК, асимметрия которого объясняется его наложением на ниспадающий сигнал ("хвост") люминесценции молекул ФС

хлорина еб, который ранее наблюдался в работе [178]. Интегральное увеличение интенсивности сигнала в диапазоне 1250-1300 нм по сравнению с фоном, обусловленным темновым током ФЭУ и "хвостом" люминесценции ФС, примерно на 36% хорошо согласуется с данными, полученными из спектров люминесценции водных растворов Радахлорина в кювете [178]. Таким образом, полученная спектральная зависимость имеет характерный пик фосфоресценции СК и хорошо согласуется с литературными данными, что подтверждает регистрацию именно сигнала фосфоресценции СК.

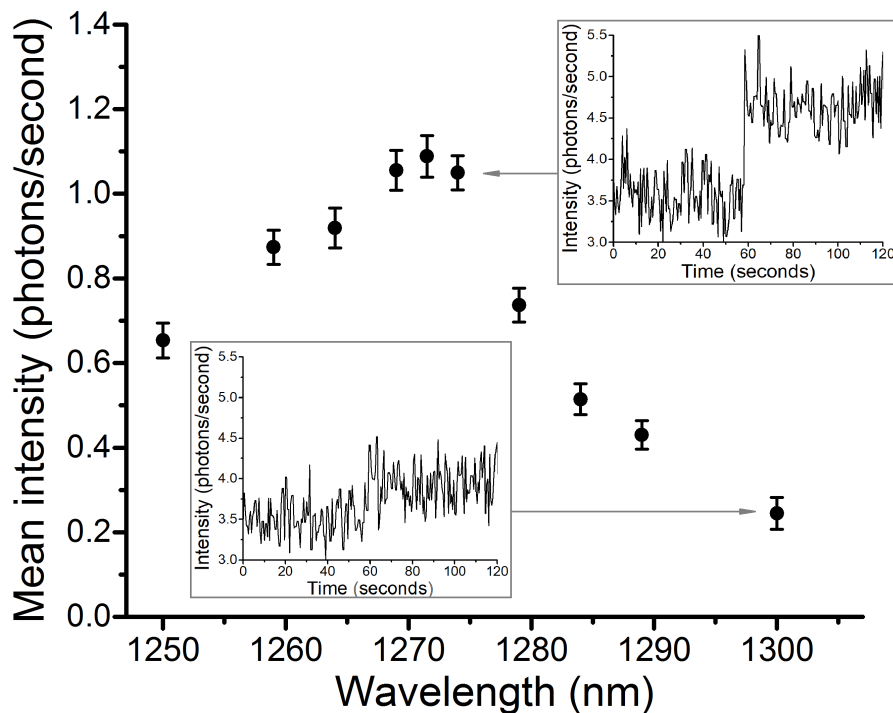


Рисунок 2.3 — Спектр люминесценции аэрозоля ФС Радахлорин в диапазоне 1250-1300 нм при возбуждении на длине волны 405 нм

Относительно низкая концентрация молекул СК в струе аэрозоля не позволила получить сигналы фосфоресценции с временным разрешением и достоверно вычислить время жизни синглетного кислорода в аэрозоли. Однако, времена жизни СК не должны существенно отличаться от типичных значений, регистрируемых в водных растворах (около 3 мкс) [179], так как подавляющее большинство молекул кислорода в аэрозоле возбуждается внутри капель водного раствора ФС.

После подтверждения того, что регистрируемый сигнал является именно результатом фосфоресценции СК было проведено исследование влияния оксигенации раствора на концентрацию генерируемого Радахлорином СК. Как

было отмечено ранее, варьирование концентрации кислорода в условиях эксперимента достигалось за счет использования чистого кислорода для образования капель аэрозоля. В ходе продувки раствора ФС кислородом в небулайзере происходило насыщение раствора кислородом, что в свою очередь приводило к увеличению концентрации растворенного кислорода. Для контроля изменения концентрации растворенного кислорода был проведен эксперимент, в ходе которого чашу небулайзера заполняли 6 мл водного раствора ФС и продували его чистым кислородом с образованием струи аэрозоля в течение различных периодов времени от 2 с до 2 мин. После чего концентрация растворенного кислорода измерялась в растворе, оставшемся в чаше небулайзера, с помощью оксиметра Water Liner WDO-64 (Metronx, Россия). В начале каждого нового измерения раствор ФС заменялся свежим с нормальным уровнем оксигенации. Динамика увеличения концентрации растворенного кислорода при формировании аэрозоля кислородом представлена на рисунке 2.4 (b).

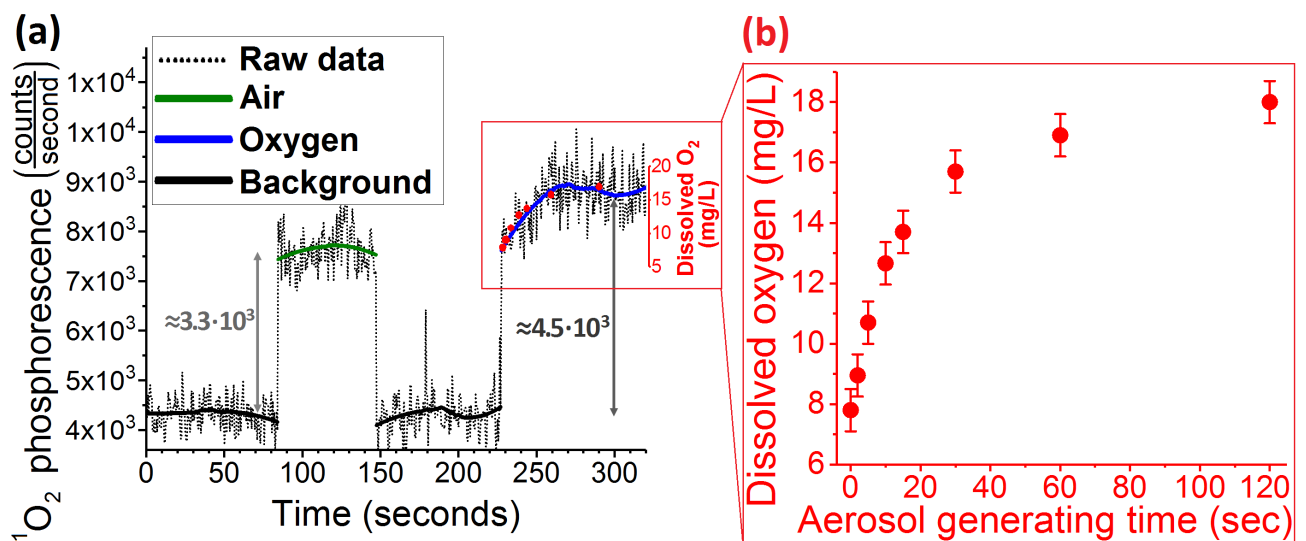


Рисунок 2.4 — (a) – Сигнал фосфоресценции синглетного кислорода в струе аэрозоля, образующейся при использовании атмосферного воздуха и чистого кислорода для формирования аэрозоли. (b) – Концентрация кислорода, растворенного в воде, в зависимости от времени продувки раствора ФС чистым кислородом.

Были получены экспериментальные сигналы фосфоресценции СК, регистрируемые при использовании для образования аэрозоля атмосферного воздуха (рис. 2.4 (a) зеленая кривая) и чистого кислорода (рис. 2.4 (a) синяя кривая). На рисунке 2.4 (в диапазонах 0-70 и 150-220 сек) также показан уровень шума - сигнал, регистрируемый при отсутствии облучения аэрозоля возбужда-

ющим лазером. Как видно, сигнал флуоресценции СК при использовании атмосферного воздуха составил $3,3 \cdot 10^3$ фотон/сек, а для чистого кислорода после насыщения раствора - $4,5 \cdot 10^3$ фотон/сек. Таким образом, увеличение сигнала флуоресценции СК при использовании чистого кислорода над сигналом, полученным при условии нормальной оксигенации раствора, составило 35%. При этом увеличение сигнала флуоресценции СК при использовании кислорода (синяя кривая рис. 2.4 (а)) происходило не скачкообразно, потребовалось около минуты для выхода сигнала на уровень плато. Динамики насыщения раствора кислородом (красные точки рис. 2.4 (b)) и увеличения сигнала флуоресценции СК (синяя кривая рис. 2.4 (а)) хорошо согласуются друг с другом, что видно при их наложении. Несмотря на одинаковые динамики, среднее значение концентрации СК в струе аэрозоля увеличилось согласно зарегистрированным сигналам флуоресценции примерно на 35% при увеличении концентрации кислорода $[^3O_2]$ в рассматриваемой системе в 2,25 раза. Этот результат можно объяснить нелинейной зависимостью средней концентрации СК $\langle [^1O_2] \rangle$ от концентрации кислорода в основном состоянии $[^3O_2]$ (см. уравнение (2.9)), полученное в ходе детального рассмотрения фотосенсибилизированных процессов при непрерывном облучении.

2.2 Сравнительный анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции синглетного кислорода на органических и неорганических поверхностях при изменении концентрации кислорода в растворе

Генерация синглетного кислорода при напылении аэрозоля на различные органические поверхности представляет практический интерес для использования фотодинамического воздействия для инактивации бактерий и вирусов на поверхностях, а также определения дозы воздействия. В то время как основные параметры, характеризующие флуоресценцию СК в водных растворах фотосенсибилизатора Радахлорин были определены ранее в работах [18; 180; 181], случай нанесения аэрозоля ФС на органические поверхности ранее не изучался. Регистрацию время-разрешенных сигналов флуоресценции СК в струе аэрозо-

ля при разных условиях оксигенации раствора осуществить было невозможно из-за потока капель ФС и низкой концентрации СК в аэрозоли. Однако, напыление ФС на поверхности разной природы позволило преодолеть эти трудности. В работе были проведены эксперименты по регистрации сигналов флуоресценции СК с временным разрешением на различных органических и неорганических поверхностях. Для проведения экспериментов использовалась оптическая установка, схема которой изображена на рисунке 2.5. В основе установки лежит время-коррелированный метод счета единичных фотонов, который был описан в разделе 1.3 для регистрации сигналов флуоресценции, но он также применим и для исследования сигналов флуоресценции СК. Время-разрешенные сигналы СК, генерируемого на поверхности образцов, регистрировались в спектральной полосе 1269-1279 нм, соответствующей пику флуоресценции СК (см. раздел 2.1 и работу [180]). Нужный спектральный диапазон выделялся в помощью монохроматора MDR-12 (ЛОМО), сигналы флуоресценции регистрировались ФЭУ NIR PMT H10330B-45 (Hamamatsu) с низким уровнем шума, работающим в режиме счета фотонов и затем обрабатывались модулем счета одиночных фотонов с временной корреляцией (TCSPC) PicoHarp 300 (PicoQuant), синхронизированным с возбуждающим лазером (см. рис.2.5). В отличие от предыдущего этапа работы возбуждение Радахлорина осуществлялось импульсным полупроводниковым лазером на длине волны 405 нм с длительностью импульса 100 нс, энергией импульса 108 нДж и частотой повторения 100 кГц. Для каждого исследуемого образца сигналы флуоресценции СК с временным разрешением 0,512 нс собирались с поверхности в течение 600 сек. Образец, на который проводилось напыление раствора ФС, крепился на предметное стекло и располагался перед входной щелью монохроматора под углом 45° к оптической оси установки. Линза, расположенная на двойном фокусном расстоянии от образца и от монохроматора, собирала сигнал флуоресценции СК в плоскости входной щели монохроматора. Исследование влияния оксигенации на временные профили флуоресценции СК происходило при непрерывном нанесении аэрозоля ФС на поверхность образца. Для образования аэрозоля использовался водный раствор ФС с концентрацией 0,7 мг/мл (≈ 1.1 мМ), диаметр капель аэрозоля варьировался в диапазоне 5-10 мкм. Также было реализовано 2 метода образования аэрозоля при продувке раствора ФС атмосферным воздухом и кислородом. Как и ранее в предыдущем разделе, расход раствора ФС для

формирования аэрозоля контролировался и поддерживался таким же, как и в экспериментах с атмосферным воздухом.

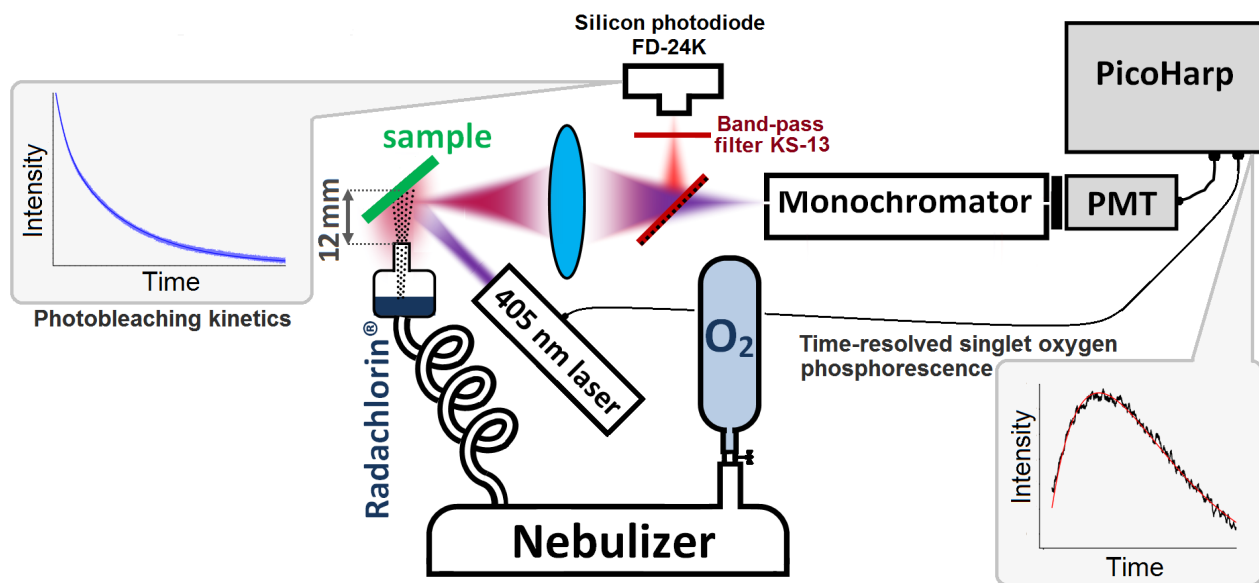


Рисунок 2.5 — Схема экспериментальной установки, используемой для регистрации время-разрешенных сигналов фосфоресценции $^1\text{O}_2$ и фотообесцвечивания ФС на поверхностях. Соответствующие типичные сигналы показаны на вставках.

В качестве моделей органических поверхностей в работе использовались три типа образцов разной природы и пористости, с разными свойствами, близкими к свойствам поверхностей, которые могут быть подвергнуты ФДВ. Для моделирования слизистых оболочек были выбраны фасциальные ткани кожных покровов курицы (образец №1) и рыбы (образец №2), а в качестве органического образца с высокой пористостью использовалась внутренняя поверхность пилепеллиса (кутикулы) шампиньона (образец №3). В качестве референтной неорганической гладкой поверхности использовалось предметное стекло.

Типичные время-разрешенные сигналы фосфоресценции СК в спектральном диапазоне 1269-1279 нм, полученные при его генерации на разных поверхностях при непрерывном нанесении аэрозоля ФС, представлены на рисунке 2.6. Эти сигналы характеризуют процессы образования и тушения $^1\text{O}_2$ в ходе импульсного возбуждения молекул ФС. На первом этапе анализа полученных сигналов проводилось уменьшение шума сигналов, который обусловлен темновым шумом ФЭУ (около 1500 фотон/сек) и фотонами рассеянного света (около 1000 фотон/сек). Численная обработка регистрируемых временных профилей была

проведена с помощью фильтра скользящего среднего с Гауссовым распределением весовых коэффициентов, диапазон фильтрации сигнала составлял 100 нс.

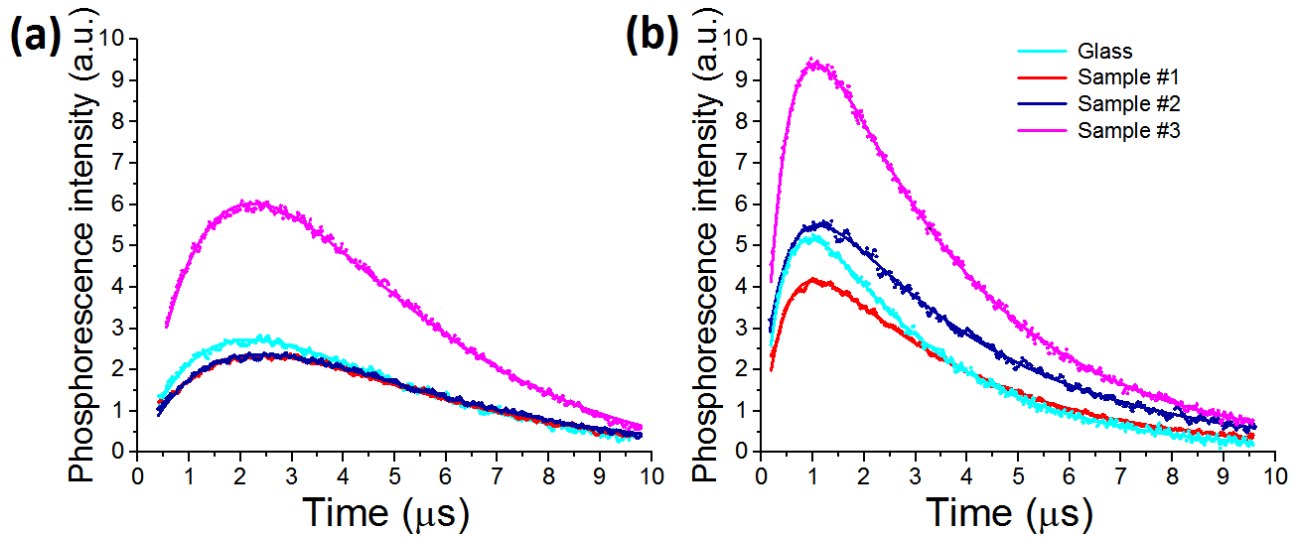


Рисунок 2.6 — Время-разрешенные сигналы фосфоресценции СК, генерируемого на разных поверхностях с ФС Радахлорин. Сигналы, полученные при использовании (а) атмосферного воздуха и (б) чистого кислорода для образования аэрозоля. Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошные линии - результат подгонки данных функцией 2.1

Как известно (см. раздел 1.1), временной профиль фосфоресценции СК представляет собой сигнал, обусловленный процессами образования и тушения 1O_2 . Таким образом, регистрируемые сигналы были подогнаны соответствующей двухэкспоненциальной моделью исследуемых процессов:

$$I_{ph}(t) = \frac{\Phi}{\tau_1 - \tau_2} \left[e^{-\frac{t}{\tau_1}} - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right] \quad (2.1)$$

где одно слагаемое описывает образование СК и характеризуется временем жизни триплетного состояния T_1 молекулы ФС (временем генерации СК), а второе - описывает деградацию СК и характеризуется временем жизни СК. Φ - площадь под кривой, пропорциональная квантовому выходу синглетного кислорода. В ходе подгонки экспериментальных данных были определены времена τ_1 и τ_2 и относительный квантовый выход СК Φ для различных поверхностей при напылении на них раствора ФС нормальной и повышенной оксигенации. Полу-

ченные результаты представлены в таблице 1 и на рисунке 2.7. Погрешность определения времен τ_1 и τ_2 составила порядка 0,3 мксек.

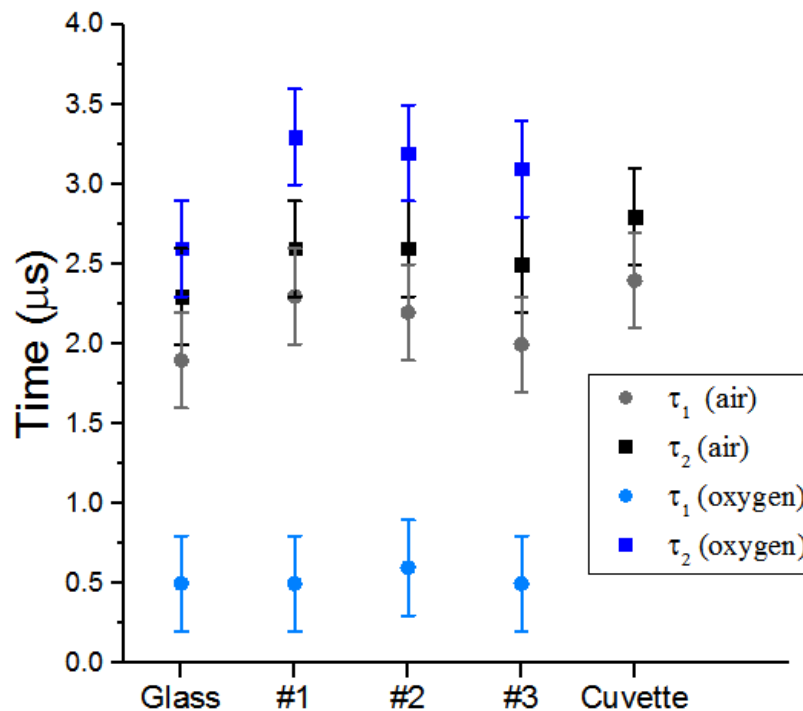


Рисунок 2.7 — Характерные времена жизни 1O_2 и триплетного состояния молекулы ФС T_1 , которые были определены в ходе анализа экспериментальных данных, представленных на рис. 2.6.

В общем случае численный анализ время-разрешенных сигналов фосфоресценции СК не позволяет определить, какое из времен τ_1 или τ_2 соответствует процессам генерации (нарастание сигнала), а какое тушению (уменьшение сигнала) молекул СК. Однако, на основе литературных данных [180; 182] и принимая во внимание изменения условий оксигенации, которые должны приводить к уменьшению времени генерации СК при повышении концентрации растворенного кислорода в растворе ФС, можно утверждать, что более короткое время τ_1 в таблице 1 соответствует процессам образования 1O_2 , а более длинное время τ_2 - процессам тушения молекул кислорода в синглетном состоянии.

Результаты, приведенные в таблице 1, демонстрируют различия обоих значений времен τ_1 и τ_2 , определенных на разных поверхностях и при разных условиях насыщения кислородом. Можно выделить основные экспериментально наблюдаемые особенности изменения параметров процессов генерации и тушения СК:

Таблица 1 — Типичные времена (τ_1 , τ_2) и относительный квантовый выход (Φ), характеризующие процессы образования и тушения молекул синглетного кислорода 1O_2 при нанесении аэрозоля ФС на разные поверхности

Образец	Продувка атмосферным воздухом			Продувка кислородом		
	Времена генерации и жизни СК (мкс)		Φ (a.u.)	Времена генерации и жизни СК (мкс)		Φ (a.u.)
	τ_1	τ_2		τ_1	τ_2	
Стекло	1.9	2.3	560	0.5	2.6	760
Образец №1	2.3	2.6	490	0.5	3.3	650
Образец №2	2.2	2.6	540	0.6	3.2	710
Образец №3	2.0	2.5	1300	0.5	3.1	1530
Кювета	2.4	2.8				

1. При использовании атмосферного воздуха для образования аэрозоля (см. второй столбец таблицы 1) время генерации СК τ_1 незначительно изменяется в рамках погрешности, при этом наименьшее значение 2,3 мкс достигалось на гладкой неорганической поверхности стекла, а наиболее длительные значения 2,6 мкс наблюдались на органических поверхностях №1 и 2, моделирующих слизистые оболочки. Кроме того, время генерации СК τ_1 на органических поверхностях оказалось таким же или немного меньшим, чем при исследовании раствора ФС в кювете.
2. При повышенной оксигенации раствора ФС время генерации 1O_2 τ_1 уменьшалось примерно в 4 раза по сравнению с условиями нормальной оксигенации раствора для всех исследуемых поверхностей (см. второй и четвертый столбцы таблицы 1). Резкое уменьшение времени генерации СК τ_1 , полученное при условиях повышенной оксигенации на всех поверхностях, в ходе реакции 2.4 ($T_1 + {}^3O_2 \xrightarrow{k_{SOF}} {}^1O_2 + S_0$, где k_{SOF} - константа скорости образования СК) объясняется тем, что скорость протекания этого процесса определяется соотношением $\tau_1 = \frac{1}{k_{SOF} \cdot [{}^3O_2]}$ и обратно пропорциональна концентрации кислорода в системе, которая в рамках эксперимента достигает уровня плато в течение 2 мин использования чистого кислорода для образования аэрозоля (см. рис. 2.4).
3. В условиях нормальной оксигенации время жизни СК τ_2 в третьем столбце таблицы 1 незначительно варьируется в пределах погрешности

- на разных поверхностях, при этом время жизни СК в кювете было немного выше, чем на всех исследуемых поверхностях.
4. В свою очередь, насыщение раствора кислородом приводит к небольшому увеличению наблюдаемого времени жизни СК τ_2 на всех поверхностях относительно значений, полученных при нормальных условиях оксигенации (третий и шестой столбцы таблицы 1). Зависимость времени генерации и тушения СК от концентрации кислорода в растворе уже изучалась ранее в других работах [183–185]. Так, в работе [185] показаны два возможных канала тушения СК, чувствительных к концентрации кислорода: взаимодействие двух молекул СК и взаимодействие СК с молекулой ФС в T_1 . При этом первый канал приводит к уменьшению времени жизни СК τ_2 , в то время как второй – к его увеличению при повышении концентрации растворенного кислорода. Эксперименты, проведенные в работе [185] при относительно низкой концентрации ФС ($20 \mu\text{M}$) показали, что СК в тех экспериментальных условиях должен тушиться преимущественно в ходе взаимодействия с другой молекулой СК. Однако, в условиях данной работы в рамках экспериментов на поверхности, где концентрация ФС составляла около 1 mM и превышала концентрацию кислорода в несколько раз, время жизни СК τ_2 продемонстрировало незначительное увеличение при насыщении кислородом, как видно из таблицы 1. Этот эффект может быть связан с преимущественным путем тушения СК молекулами ФС в триплетном состоянии T_1 , которое проходит с константой скорости реакции k_{DF} . В этом случае время жизни СК $\tau_2 = \frac{1}{k_{DF}[T_1]}$ обратно пропорционально концентрации триплетного состояния ФС $[T_1]$, которая может уменьшаться с увеличением количества кислорода в системе из-за процессов фотообесцвечивания ФС, как будет показано в разделе 2.3, согласно уравнению (2.12).
 5. Значения относительного квантового выхода СК Φ , полученные из экспериментальных время-разрешенных сигналов флуоресценции СК (см. рис. 2.6) представлены в четвертом и седьмом столбцах таблицы 1 и имеют одинаковые значения в пределах погрешностей измерения для всех исследованных поверхностей при одинаковых условиях оксигенации, за исключением высокопористой органической поверхности об-

разца №3 (кутикулы гриба), для которого Φ был примерно в два раза больше, чем на других поверхностях, как при использовании воздуха, так и кислорода для формирования аэрозоля. Как известно, квантовый выход СК Φ_{Δ} прямо пропорционален средней концентрации СК и в условиях эксперимента может быть представлен в виде [18]:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_T \frac{k_{SOF}[{}^3O_2]}{k_{SOF}[{}^3O_2] + k_{TT}[T_1] + \gamma_T}, \quad (2.2)$$

где константы скорости реакций $k_{SOF}[{}^3O_2]$, $k_{TT}[T_1]$ и γ_T характеризуют тушение триплетного состояния ФС в ходе фотосенсибилизированной генерации СК, триплет–триплетной (Т-Т) аннигиляции и других реакций, соответственно. Φ_T - квантовый выход состояния T_1 молекулы ФС, который равен $\Phi_T = \tau_{int}/(\tau_{fl} + \tau_{int})$, где τ_{int} - время безызлучательного интеркомбинационного перехода молекул ФС в состояние T_1 и τ_{fl} - время затухания флуоресценции ФС.

Из уравнения (2.2) видно, что одинаковые экспериментальные значения относительного квантового выхода Φ в третьем столбце таблицы 1 могут быть объяснены схожими условиям тушения триплетного состояния ФС на всех исследованных поверхностях за исключением органической поверхности №3.

Вместе с тем стоит отметить, что насыщения напыляемого раствора фотосенсибилизатора Радахлорин кислородом приводит к увеличению относительного квантового выхода примерно на 28% для всех исследуемых поверхностях.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют разные скорости генерации и тушения СК на разных поверхностях при нормальных условиях оксигенации, при этом τ_1 и τ_2 , полученные в ходе контрольного эксперимента по исследованию водного раствора Радахлорина в кювете (последняя строка в таблице 1), хорошо согласуются с литературными данными [183; 186; 187].

2.3 Исследование процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на органических и неорганических поверхностях при изменении концентрации кислорода в растворе

Исследование процессов фотообесцвечивания ФС Радахлорин проводилось на тех же типах органических поверхностей при использовании аналогичных параметров формирования аэрозоли, что и в ходе изучения флуоресценции синглетного кислорода, описанного в предыдущем разделе. Однако для исследования процессов фотообесцвечивания Радахлорина на органических поверхностях напыление аэрозоли не было постоянным. Водный раствор Радахлорина в концентрации 0,7 мг/мл (≈ 1.1 мМ) напылялся на поверхность образца в течение 4 секунд. При этом сопло небулайзера, расположенное на расстоянии 12 мм от поверхности, обеспечивало подачу примерно 40 мкл раствора на 1 см² поверхности образца в каждом эксперименте по мониторингу фотообесцвечивания Радахлорина. Как было описано ранее в разделе 2.2, формирование аэрозоля осуществлялось с помощью атмосферного воздуха или при продувке раствора ФС чистым кислородом для варьирования условий оксигенации раствора ФС. После напыления аэрозоля проводилось измерение динамики интенсивности флуоресценции ФС при непрерывном возбуждении диодным лазером на длине волны 405 нм с плотностью мощности 145 мВт/см². Изменение сигналов интенсивности флуоресценции в ходе фотообесцвечивания Радахлорина на различных поверхностях регистрировалось с помощью экспериментальной установки, изображенной на рис. 2.5, после выключения небулайзера. Сигнал флуоресценции ФС с поверхности образца спектрально выделялся фильтром КС-13 (600-2500 нм, ЛенЗОС, Россия) и фокусировался собирающей линзой в плоскость, где был установлен кремниевый фотодиод ФД-24К. Кинетика интенсивности сигнала флуоресценции ФС регистрировалась цифровым осциллографом RTB2000 (Rohde&Schwarz) с временной дискретизацией сигнала 4,3 мс до тех пор, пока интенсивность флуоресценции ФС в ходе непрерывного облучения не достигала значения фона. Численная обработка экспериментальных данных с использованием фильтра скользящего среднего позволила уменьшить шум регистрируемых кинетик фотообесцвечивания. В ходе работы для каждого

образца было получено несколько экспериментальных сигналов для получения статистически значимых результатов. Типичные динамики интенсивности флуоресценции ФС Радахлорин, напыленного на разные органические поверхности в условиях нормальной оксигенации раствора, при непрерывном облучении лазером на длине волны 405 нм представлены на рисунке 2.8.

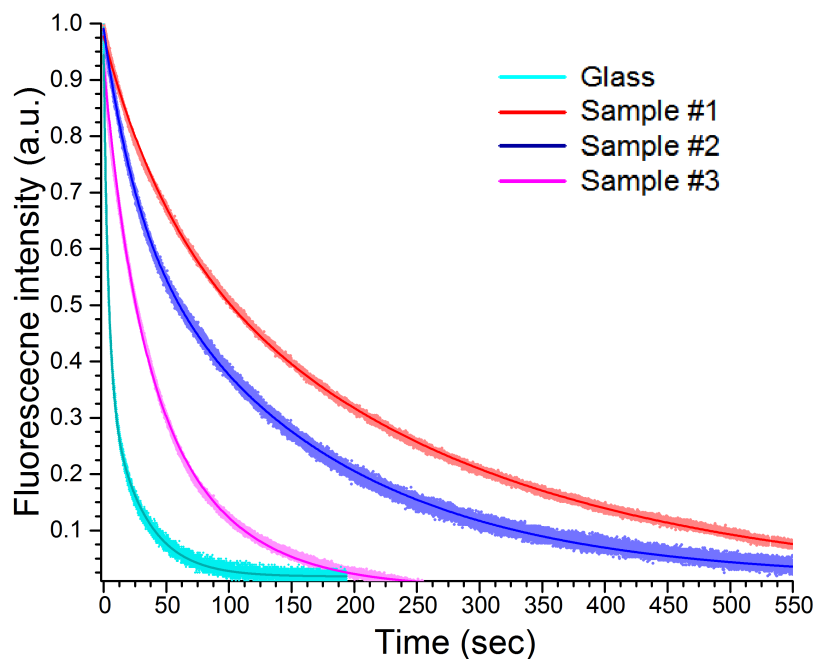


Рисунок 2.8 — Динамика интенсивности флуоресценции Радахлорина, нанесенного на разные поверхности, при непрерывном возбуждении молекул ФС в условиях нормальной оксигенации.

Численное описание процессов фотообесцвечивания возможно разными методами (см. раздел 1.2), в частности определение констант скорости фотообесцвечивания растворов в ходе подгонки экспериментальных данных экспоненциальными функциями широко применяется в научной литературе [88]. В рамках данной работы полученные кинетики флуоресценции в процессе фотообесцвечивания ФС представляли собой сигналы, которые хорошо описывались функцией:

$$I(t) = a_1 e^{-\frac{t}{\tau_{bl1}}} + a_2 e^{-\frac{t}{\tau_{bl2}}} + C_0 \quad (2.3)$$

Полученные в ходе анализа экспериментальных динамик интенсивности флуоресценции ФС характерные времена фотообесцвечивания τ_{bl1} и τ_{bl2} , усред-

Таблица 2 — Амплитуды и константы скорости кинетик фотообесцвечивания Радахлорина, нанесенного на разные органические поверхности.

	a_1 , a.u.	τ_{bl1} , s	a_2 , a.u.	τ_{bl2} , s
Стекло	0.57	3.8	0.35	27.8
Образец №1	0.27	49.5	0.69	248
Образец №2	0.31	26.4	0.66	162
Образец №3	0.34	22.5	0.58	63.5

ненные по нескольким измерениям (не менее 10 измерений), для каждого типа поверхности представлены в таблице 2. Как видно из таблицы 2, характерные времена фотообесцвечивания ФС, нанесенного на разные поверхности, значительно варьируются в зависимости от типа и структуры поверхности.

Как отмечалось ранее в работах [18; 99], кинетики фотообесцвечивания водных растворов Радахлорина, полученные при исследовании флуоресценции ФС в кювете, носят одноэкспоненциальный характер. При этом, результаты мониторинга изменений интенсивности флуоресценции Радахлорина на органических поверхностях позволили зарегистрировать ярко выраженное отклонение формы сигнала от одноэкспоненциальной зависимости. Кроме того, как видно из рис. 2.8 и таблицы 2 характерные времена фотообесцвечивания ФС на органических поверхностях существенно меньше (в 10 раз) времени фотообесцвечивания на неорганической поверхности стекла. Стоит отметить, что кинетики, зарегистрированные на разных участках одного и того же образца, могли незначительно отличаться, однако эти различия были намного меньше, чем разница, наблюдаемая между типами поверхностей.

Процессы, происходящие на молекулярном уровне в ходе ФДВ и приводящие к потере способности ФС флуоресцировать, рассматривались ранее разными научными группами, преимущественно для водных растворов (см. раздел 1.2, [18]). Реакции, происходящие в ходе ФДВ и приводящие к фотообесцвечиванию ФС Радахлорин в упрощенной модели представлены схематически на рисунке 2.9. Как обсуждалось ранее в разделе 1.1, в рамках эксперимента при возбуждении молекул ФС лазерным излучением на длине волны 405 нм происходило заполнение второго синглетного возбужденного состояния S_2 ФС (см. схему 2.9). В результате быстрых безызлучательных интеркомбинационных переходов молекулы ФС переходили в низшее триплетное состояние T_1 , а при контакте молекулы ФС в состоянии T_1 с молекулой кислорода в основном

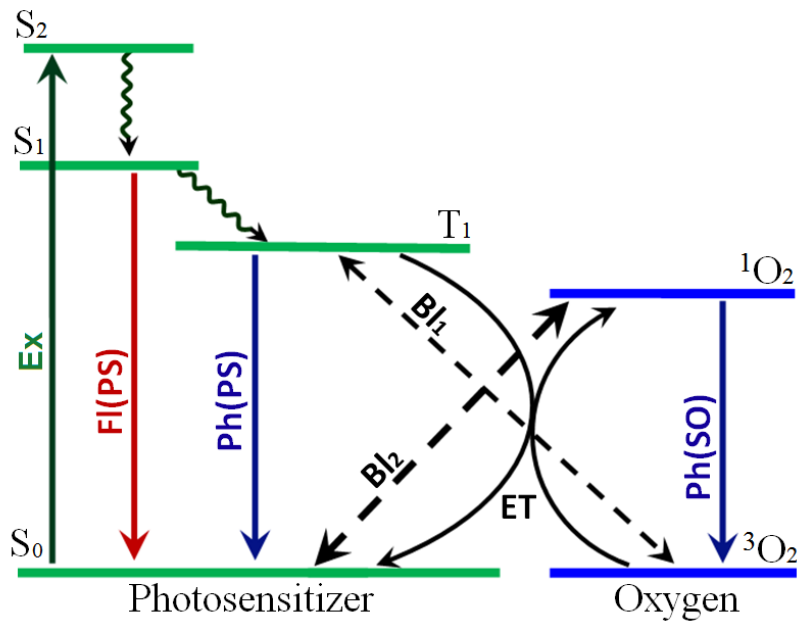
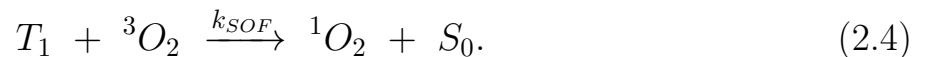


Рисунок 2.9 — Схема энергетических уровней молекул ФС и кислорода, а также фотофизические и фотохимические процессы, связанные с генерацией СК (¹O₂): Ex - переход ФС в синглетное состояние S₂ при возбуждении на длине волны 405 нм; Fl(PS) - флуоресценция ФС из синглетного состояния S₁; Ph(PS) и Ph(SO) - фосфоресценция из триплетного состояния молекулы ФС T₁ и СК соответственно; Bl₁ и Bl₂ - процессы фотообесцвечивания с переносом электронов; ET - реакция переноса энергии, приводящая к образованию СК.

состоянии ³O₂ происходила генерация синглетного кислорода ¹O₂:



Можно выделить основные реакции, происходящие в процессе фотодинамического воздействия и приводящие к изменению концентрации ФС:

1. ${}^1S_0 - {}^1O_2$ (константа скорости k_{PSO}). Окисление молекулы ФС в основном состоянии СК в ходе реакции с переносом электрона обозначена пунктирной линией (Bl₂) на рисунке 2.9. В работе [18] по исследованию Радахлорина в водном растворе было показано, что данный тип реакции является доминантным процессом при фотообесцвечивании ФС, однако в условиях эксперимента необходимо рассматривать и другие процессы.
2. $T_1 - {}^3O_2$ (константа скорости k_{TO}). Взаимодействие молекул может приводить как к фотосенсибилизированной генерации СК (ET, рис.2.9),

так и к реакции с переносом электрона и образованию не флуоресцирующих фотопродуктов ($B1_1$, рис.2.9).

3. $T_1 - {}^1O_2$ (константа скорости k_{DF}) - эффект "задержанной флуоресценции при котором молекула ФС переходит в состояние 1S_0 [66].
4. $T_1 - T_1$ (константа скорости k_{TT}) - триплет-триплетная аннигиляция ФС [25].

На основании указанных процессов, приводящих к изменению концентрации молекул ФС, уравнение, описывающее изменение концентрации молекул ФС в триплетном состоянии T_1 , может быть записано в виде:

$$\frac{d[T_1]}{dt} = C[{}^1S_0] - [T_1][{}^3O_2]k_{SOF} - [T_1][{}^1O_2]k_{DF} - [T_1][T_1]k_{TT} - [T_1]\gamma_T, \quad (2.5)$$

где $[{}^1S_0]$ - концентрация молекул ФС в основном состоянии, k_{TT} - коэффициент скорости триплет-триплетной аннигиляции ФС [25], а γ_T - скорость тушения триплетного состояния T_1 , обусловленная всеми другими реакциями. Второе слагаемое в правой части уравнения 2.5 соответствует процессу генерации СК в ходе реакции 2.4, а третий - "задержанной флуоресценции" обсуждаемой ранее.

В свою очередь, константа C в уравнении (2.5) может быть представлена в виде:

$$C = \frac{\sigma_{ab}I_0}{\hbar\omega}\Phi_T, \quad (2.6)$$

где σ_{ab} - поперечное сечение поглощения лазерного пучка, I_0 - интенсивность лазерного излучения на единицу площади, $\hbar\omega$ - энергия поглощенного фотона, $\Phi_T = \tau_{fl}/(\tau_{int} + \tau_{fl})$ - квантовый выход интеркомбинационной конверсии ФС из синглетного в триплетное состояние, τ_{fl} - время затухания флуоресценции ФС, а τ_{int} - время внутренней конверсии из синглетных в триплетные мультиплеты ФС.

Согласно литературным данным, представленным в работах [80; 90], время жизни триплетного состояния $\tau_T = \gamma_T^{-1}$ в производных хлорина e_6 может быть оценено около 300 нс.

Тогда, в уравнении (2.5) слагаемым, содержащим γ_T можно пренебречь. Вместе с тем, стоит отметить, что скорости протекания реакций (${}^1S_0 - {}^1O_2$,

$T_1 - {}^3O_2$ и $T_1 - {}^1O_2$), приводящих к изменению концентрации молекул ФС в состоянии T_1 , напрямую зависят от концентрации молекул кислорода [3O_2] в системе. Таким образом, для описания экспериментальных результатов изменения интенсивности флуоресценции в ходе фотообесцвечивания необходимо рассматривать не только изменение концентрации молекул ФС в состоянии T_1 , а также изменение концентрации кислорода, в ходе непрерывного облучения ФС на органических поверхностях.

В рамках эксперимента концентрация СК определялась его генерацией в ходе реакции 2.4 и тремя основными каналами тушения СК в рассматриваемой системе: при взаимодействии с молекулой ФС в триплетном состоянии T_1 , с другой молекулой СК 1O_2 и другими путями тушения СК, не обусловленными наличием в системе T_1 и 1O_2 . Тогда изменение концентрации СК можно приблизительно записать в виде:

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = [T_1][{}^3O_2]k_{SOF} - [T_1][{}^1O_2]k_{DF} - [{}^1O_2][{}^1O_2]k_{SO} - [{}^1O_2]\gamma_{SOD}, \quad (2.7)$$

где [3O_2], [1O_2] и [T_1] - концентрации кислорода O_2 в основном состоянии, в возбужденном 1O_2 синглетном состоянии и ФС в T_1 триплетном соответственно, k_{SO} - константа скорости тушения СК из-за взаимодействия с другой молекулой СК, соответственно, а γ_{SOD} - скорость тушения СК в ходе других реакций, например в ходе окисления органических молекул или столкновения с молекулами растворителя.

Стоит обратить внимание, что константа скорости тушения СК k_{DF} описывает процесс взаимодействия СК 1O_2 с молекулой ФС в триплетном возбужденном состоянии T_1 . Этот процесс может быть ярко выражен при высоких концентрациях ФС и может приводить к эффекту "задержанной флуоресценции" (delayed fluorescence, DF), наблюдавшейся, например, в работе [66] для разных видов ФС. В ходе взаимодействия происходит переход молекулы ФС из состояния T_1 обратно в возбужденное синглетное состояние S_1 при передаче энергии от СК 1O_2 и перехода молекулы кислорода в основное состояние 3O_2 , что приводит к тушению СК.

В свою очередь, процессы тушения СК в ходе реакций, не обусловленных взаимодействиями с T_1 и 1O_2 (γ_{SOD}), можно разделить на два канала: не меняющие (oxygen-preserving, *pr*) и меняющие (oxygen-losing, *lo*) концентрацию

кислорода в исследуемой системе. Тогда константу скорости тушения СК γ_{SOD} в уравнении 2.7 можно представить в виде:

$$\gamma_{SOD} = \gamma_{SOD}^{(pr)} + \gamma_{SOD}^{(lo)}. \quad (2.8)$$

где $\gamma_{SOD}^{(pr)}$ и $\gamma_{SOD}^{(lo)}$ - константы скорости реакций тушения СК, в ходе которых, соответственно, сохраняется и меняется концентрация кислорода в системе. В качестве реакций, не связанных с кислородом ($\gamma_{SOD}^{(pr)}$), можно рассматривать процессы тушения СК в ходе неупругих столкновений с окружающими молекулами растворителя, например с H_2O . Тогда $\gamma_{SOD}^{(pr)}(H_2O) = [W]k_W$, где $[W]$ - концентрация молекул воды, а k_W - соответствующая константа скорости тушения СК. Известно, что типичные времена таких процессов тушения СК лежат в микросекундном диапазоне [25]. Вместе с тем, характерными реакциями, сопровождающимися изменением концентрации кислорода ($\gamma_{SOD}^{(lo)}$), являются процессы окисления любых молекул в системе синглетным кислородом, в том числе реакция между молекулами СК и ФС в основном состоянии S_0 [25; 188]. В частности, этот тип реакций обычно приводит к фотообесцвечиванию ФС (см. раздел 1.2) в рамках временного диапазона в несколько секунд.

Из-за относительно медленных окислительных процессов, приводящих к необратимому изменению концентрации кислорода в системе, по сравнению с быстрыми циклами генерации в ходе реакции 2.4 и тушения СК, средняя концентрация СК в системе при возбуждении молекул ФС непрерывным лазерным излучением может быть получена при устремлении производной из уравнения 2.7 к нулю:

$$\langle [{}^1O_2] \rangle \approx \frac{(k_{DF}[T_1] + \gamma_{SOD})}{2k_{SO}} \left[\left(1 + \frac{4k_{SO}k_{SOF}[T_1][{}^3O_2]}{(k_{DF}[T_1] + \gamma_{SOD})^2} \right)^{1/2} - 1 \right]. \quad (2.9)$$

Угловые скобки в левой части уравнения 2.9 обозначают усреднение по времени в микросекундном диапазоне. При относительно низких концентрациях кислорода в основном состоянии 3O_2 , выражение 2.9 может быть упрощено следующим образом:

$$\langle [{}^1O_2] \rangle \approx \frac{k_{SOF}[T_1][{}^3O_2]}{(k_{DF}[T_1] + \gamma_{SOD})}. \quad (2.10)$$

Реакции, приводящие к изменению концентрации молекул ФС в состоянии T_1 в рассматриваемой системе, происходят на несколько порядков медленнее, чем реакция фотосенсибилизированной генерации СК, которая происходит без необратимого изменения концентрации ФС (2.4). Наблюдаемые эффекты фотообесцвечивания ФС на органических поверхностях могут быть объяснены при рассмотрении вышеперечисленных реакций. Тогда, принимая во внимание вышесказанное, выражение для средней концентрации ФС в состоянии T_1 , при условии усреднения в микросекундном диапазоне, полученное из уравнения (2.5) принимает вид:

$$\langle [T_1] \rangle \approx \frac{k_{SOF}[{}^3O_2] + k_{DF}[{}^1O_2]}{2k_{TT}} \left[\left(1 + \frac{4Ck_{TT}[{}^1S_0]}{(k_{SOF}[{}^3O_2] + k_{DF}[{}^1O_2])^2} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (2.11)$$

При относительно низких концентрациях ФС в основном состоянии ($[{}^1S_0]$) уравнение (2.11) может быть представлено в виде:

$$\langle [T_1] \rangle \approx \frac{C[{}^1S_0]}{k_{SOF}[{}^3O_2] + k_{DF}[{}^1O_2]} \quad (2.12)$$

Стоит отметить, что в случае относительно низкой концентрации молекул ФС ($[{}^1S_0]$) средняя концентрация молекул ФС в триплетном состоянии $\langle [T_1] \rangle$ обратно пропорциональна концентрации молекул кислорода. С другой стороны, при очень высокой концентрации ФС ($[{}^1S_0]$) средняя концентрация молекул ФС в триплетном состоянии $\langle [T_1] \rangle$ не зависит от концентрации кислорода (см. уравнение (2.12)).

Усреднение по времени концентрации молекул фотосенсибилизатора T_1 и кислорода 1O_2 в уравнениях (2.9) и (2.11) проводилось в микросекундном диапазоне. При этом предполагается, что концентрации молекул ФС и кислорода в других состояниях, указанные в уравнениях (2.9) и (2.11), медленно зависят от времени в рамках процесса фотообесцвечивания ФС в ходе реакций с пере-

носом электронов. Как видно, полученные уравнения (2.9) и (2.11) нелинейны и взаимосвязаны, поэтому исследуемые процессы фотообесцвечивания ФС и генерации синглетного кислорода были рассмотрены совместно при анализе экспериментальных результатов.

При исследовании процессов фотообесцвечивания ФС в кювете, представленных в литературе (см. раздел 1.2), концентрация кислорода [3O_2] со временем не менялась и существенно превышала концентрацию молекул ФС ($[^1S_0]$) в системе. При этом фотообесцвечивание ФС преимущественно происходит в ходе реакции с переносом электрона $T_1 - ^3O_2$ (В1₁, рис.2.9), а динамика изменения интенсивности флуоресценции представляет собой одноэкспоненциальную зависимость [18].

В нашем случае наблюдение кинетики фотообесцвечивания Радахлорина на органических поверхностях проводилось при существенно иных условиях. Так, оценочная концентрация молекул кислорода в наносимом на поверхность растворе составляла $\approx 1,69 \cdot 10^{20}$ шт/л, в то время как концентрация молекул ФС была в несколько раз выше, около $7 \cdot 10^{20}$ шт/л. Вместе с тем, из-за присутствия в системе органических соединений становятся возможными реакции окисления этих биологических молекул синглетным кислородом, образующимся в результате реакции (2.4). В этом случае концентрацию кислорода [3O_2] в системе нельзя считать постоянной, так как она уменьшалась в ходе окислительных реакций, что приводило к уменьшению скорости протекания реакций, зависящих от концентрации кислорода, а именно: $^1S_0 - ^1O_2$, $T_1 - ^3O_2$ и $T_1 - ^1O_2$.

Таким образом, отклонение кинетик затухания от одноэкспоненциального характера, наблюдавшегося в работе [18] для водного раствора Радахлорина в кювете, и резкое различие между полученными скоростями фотообесцвечивания ФС на разных поверхностях (см. таблицу 2), можно объяснить тем, что на органических поверхностях происходит медленное изменение концентрации кислорода в системе из-за окислительных реакций, проходящих при возбуждении ФС лазерным излучением в течение секунд. При этом, окисление органических соединений более вероятно на пористых поверхностях (фасциальные ткани и кутикула гриба), чем на гладкой поверхности стекла, что объясняет полученные экспериментальные результаты (рис. 2.8) и разные скорости фотообесцвечивания на разных поверхностях, обусловленные разными скоростями изменения концентрации кислорода в системе.

Необходимо отметить, что, как упоминалось выше, концентрация ФС, используемая в наших экспериментах, была довольно высокой и составляла примерно 1 мМ, что, вероятно, приводило к агрегации ФС [80]. Потенциальная агрегация молекул ФС может рассматриваться как альтернативная причина разных скоростей затухания флуоресценции, наблюдаемых на разных поверхностях. Однако в этом случае скорость изменения флуоресценции, обусловленная агрегацией, скорее всего не должна зависеть ни от интенсивности лазерного излучения, ни от концентрации кислорода. Для проверки нами были проведены эксперименты по исследованию динамики фотообесцвечивания ФС при изменении условий оксигенации и режима облучения.

Был проведен контрольный эксперимент при тех же условиях, но при выключении возбуждающего лазера на 2 минуты. Типичная кинетика фотообесцвечивания приведена на рисунке 2.10, где хорошо видно, что при отсутствии облучения не происходит процессов, приводящих к изменению интенсивности сигнала флуоресценции. Таким образом, можно утверждать, что в условиях эксперимента фотообесцвечивание Радахлорина на поверхности происходит только при освещении.

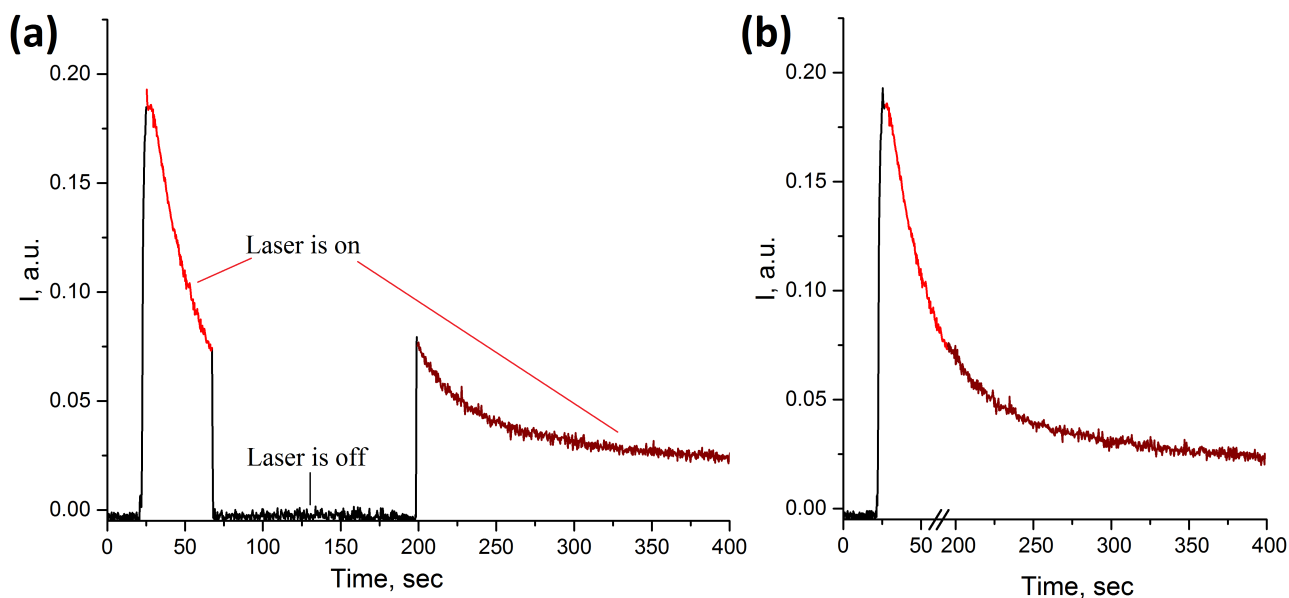


Рисунок 2.10 — Динамика интенсивности флуоресценции Радахлорина, нанесенного на поверхность модели слизистой ткани (образец № 1) при облучении (a) с перерывом на 2 минуты и (b) при "сшивании" сигнала до и после прерывания облучения

Анализ влияния уровня оксигенации раствора на скорость протекания процессов фотообесцвечивания проводился при использовании чистого кислоро-

да для формирования аэрозоля, наносимого на исследуемые поверхности, при этом другие условия эксперимента были такими же, как и при нормальном уровне насыщения кислородом. Кривые изменения интенсивности флуоресценции при непрерывном облучении поверхностей с Радахлорином при двух уровнях насыщения кислородом раствора ФС представлены на рисунке 2.11. Как видно из результатов, представленных на рисунке 2.11, скорость фотообесцвечивания ФС на всех поверхностях значительно увеличивается при повышении оксигенации раствора.

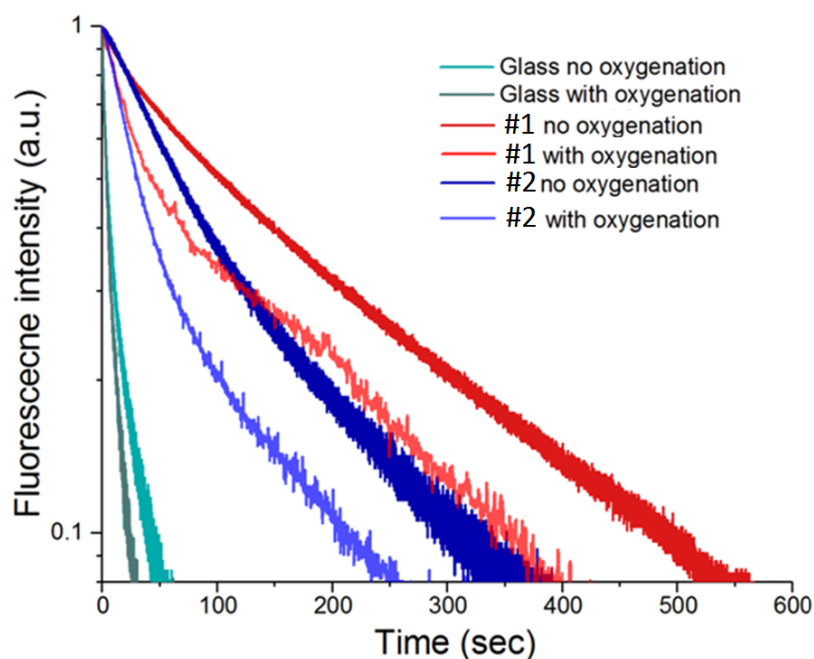


Рисунок 2.11 — Динамика интенсивности флуоресценции Радахлорина, нанесенного на разные поверхности, при непрерывном возбуждении молекул ФС в условиях нормальной и повышенной оксигенации.

Таким образом, результаты проведенных контрольных экспериментов позволяют подтвердить, что резкая разница между скоростями фотообесцвечивания ФС на разных поверхностях обусловлена главным образом эффективными потерями молекул кислорода в реакциях окисления при лазерном облучении.

Необходимо отметить, что характерные времена фотообесцвечивания τ_{bl1} и τ_{bl2} , приведенные в таблице 2, на 1-2 порядка меньше, чем время затухания одноэкспоненциальной кинетики фотообесцвечивания Радахлорина в кювете полученное в работах [18; 99]. При сравнении времен фотообесцвечивания Радахлорина на поверхностях и в кювете [18; 99] необходимо иметь в виду используемые плотности мощности возбуждающего лазерного излучения I_0 , так

как скорость фотообесцвечивания пропорциональна плотности мощности облучения I_0 . В нашем случае плотность мощности при освещении поверхностей была примерно в 3 раза выше, чем в экспериментах, описанных в работах [18; 99] (145 против 50 МВт/см²). Кроме того, увеличение концентрации ФС (более чем на два порядка по сравнению с работами [18; 99]) в экспериментах на поверхностях приводила к значительному увеличению скорости фотообесцвечивания из-за химических реакций переноса электронов $T_1 - T_1$, $^1S_0 - ^1O_2$ и $T_1 - ^1O_2$, что привело к многоэкспоненциальному изменению концентрации ФС в состоянии [1S_0]. При этом, как было отмечено в работах [18; 99], при малой концентрации ФС эти реакции не вносили существенный вклад в фотообесцвечивание. Таким образом, мы полагаем, что указанные факторы являются основными причинами существенно различающихся абсолютных значений скоростей фотообесцвечивания в наших экспериментах на поверхностях и данных, полученных в работах [18; 99].

Заметим, что существуют также другие факторы, которые могли привести к наблюдаемому двухэкспоненциальному затуханию флуоресценции Радахлорина. При высокой концентрации молекул ФС кластеризация ингредиентов Радахлорина могла быть существенной, что могло привести к отклонению кинетики фотообесцвечивания от одноэкспоненциальной функции. Кроме того, вклад дополнительных активных солей, содержащихся в Радахлорине в малой концентрации, мог стать заметным в сигнале флуоресценции наряду с вкладом основного компонента хлорина еб в процессе его фотодеградации.

Таким образом, в данной главе зарегистрирован спектр фосфоресценции СК в диапазоне 1250-1300 нм в струе аэрозоли фотосенсибилизатора Радахлорин, подтверждающий фотосенсибилизированную генерацию СК в исследуемой мелкодисперсной среде. Показано, что использование чистого кислорода для генерации аэрозоля приводит к увеличению интенсивности сигнала фосфоресценции СК, а динамика нарастания сигнала схожа со скоростью увеличения растворенного кислорода при продувке раствора кислородом. Получены время-разрешенные сигналы фосфоресценции СК на органических поверхностях при изменении концентрации растворенного кислорода демонстрирующие резкое уменьшение времени генерации и небольшое увеличение времени жизни СК. Анализ время-разрешенных сигналов фосфоресценции СК показал увеличение относительного квантового выхода на $\approx 28\%$ при обогащении

раствора фотосенсибилизатора Радахлорин кислородом. Исследованы процессы фотообесцвечивания Радахлорина на органических поверхностях при разных условиях оксигенации. Получено и теоретически обосновано, что резкая разница между скоростями фотообесцвечивания ФС на разных органических поверхностях обусловлена главным образом эффективными потерями молекул кислорода в реакциях окисления при лазерном облучении.

Глава 3. Исследование время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах и во внутриклеточной среде

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 (АФК) [13]. Кроме того, такие параметры как время затухания и анизотропия флуоресценции, а также время вращательной диффузии, определяемые время-разрешенными флуоресцентными методами, используются для измерения параметров микроокружения молекул ФС в растворах и клетках [11].

Влияние ФС Радахлорин на клетки и на ткани как агента, генерирующего активные формы кислорода, хорошо изучено, однако его флуоресцентные свойства преимущественно исследовались лишь в водных растворах. При этом, как известно, по параметрам флуоресценции флуорофора возможно исследовать свойства его микроокружения, что может позволить улучшить качество фотодиагностики, определения необходимой дозы препарата в зависимости от индивидуальных особенностей пациента и от типа и локализации опухоли. До настоящего времени было проведено лишь несколько детальных исследований параметров флуоресценции фотосенсибилизаторов в зависимости от условий микроокружения в растворах и клетках, в том числе для ФС Фотофрин [189], РrIX [190], Фоскан [191], Себ [192], фотодитазин [193] и mTHPC [126]. Таким образом, исследование характеристик флуоресценции ФС Радахлорин в различных условиях является актуальной задачей с широким последующим применением в области медицины и цитологии.

В данной главе представлены результаты проведенного комплексного исследования сигналов флуоресценции ФС Радахлорин с временным разрешением в растворах и во внутриклеточной среде. В разделе 3.1 представлены результаты исследования влияния кислотности и полярности на параметры флуоресценции Радахлорина, определены зависимости ее относительного квантового выхода и времени затухания. Исследование анизотропии флуоресценции и времени

вращательной диффузии в растворах разной кислотности, вязкости и полярности, а также результаты анализа полученных данных описаны в разделе 3.3. В разделе 3.2 представлены результаты исследования влияния условий микроокружения молекул ФС (кислотности и полярности растворителя) на фотосенсибилизированную генерацию синглетного кислорода, вычислен относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода в зависимости от рН и полярности раствора. Полученные результаты исследования параметров сигналов флуоресценции ФС в растворах были использованы для анализа свойств микроокружения во внутриклеточной среде, где наблюдалась сильная корреляция между изменениями времени затухания флуоресценции ФС и различиями в значениях рН во внутриклеточных структурах (см. раздел 3.4).

3.1 Влияние кислотности и полярности растворов на параметры время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин

Как отмечалось ранее в разделе 1.3 варьирование условий микроокружения молекул ФС может привести к изменению параметров его флуоресценции, в частности времени затухания флуоресценции, из-за изменения скорости процессов безызлучательной релаксации (см. уравнение 1.1). Известно (см. раздел 1.1.1), что фотосенсибилизаторы на основе хлорина еб чувствительны к изменению кислотности растворителя. Так, наблюдалось изменение положения максимумов спектров поглощения и флуоресценции, а также уменьшение интенсивности флуоресценции с уменьшением рН, что связывают с ионизацией карбоксильных групп молекулы хлорина еб и протонированием атома азота в гетероцикле [17]. Для Радахлорина подобные исследования ранее не проводились. В настоящем разделе приведены результаты исследования параметров время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина при изменении уровня кислотности и полярности растворов.

Экспериментальное наблюдение время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в растворах разной кислотности и полярности проводилось с использованием время-коррелированного метода счета единичных фо-

тонов (TCSPC) с помощью TCSPC модуля SPC-150N (Becker&Hickl). Сигналы флуоресценции ФС регистрировались гибридными датчиками GaAsP HPM-100-40 (Becker&Hickl) с временным откликом (IRF) 120 пс, которые работали в режиме счета одиночных фотонов. Для возбуждения молекул Радахлорина в растворах использовался пикосекундный лазер BDS-SM-405-PS-101 (Becker&Hickl) с длительностью импульса 60 пс и частотой повторения импульсов 20 МГц, излучающий на длине волны 405 нм, соответствующей максимуму полосы поглощения Радахлорина (см. рисунок 1.4). Из-за относительно длительного времени затухания флуоресценции Радахлорина (до 5,5–6 нс [179]) низкая частота следования лазерных импульсов позволяла регистрировать кривые затухания сигнала флуоресценции полностью. Сигнал флуоресценции Радахлорина выделялся полосовым интерференционным фильтром BP645/75 (Chroma), с полосой пропускания соответствующей максимуму спектра флуоресценции Радахлорина (см. рисунок 1.4), а для отсекающего возбуждающего лазерного излучения использовался длинноволновый фильтр LP425 (Chroma). Время накопления сигналов составляло 10-100 с для достижения количества регистрируемых фотонов не менее 10^5 . Анализ экспериментальных сигналов проводился с помощью программного обеспечения SPCImage NG Data Analysis для подгонки результатов одноэкспоненциальными функциями с учетом временного отклика датчиков и профиля лазерного импульса для вычисления времени затухания флуоресценции.

Параметры профилей затухания флуоресценции Радахлорина исследовались в водных растворах PBS (фосфатный буфер, pH=7,5) с разными значениями кислотности (pH), которые варьировались в диапазоне 3-10 с помощью добавления небольшого количества HCl и KOH. Исследование времен затухания флуоресценции в водно-спиртовых растворах разной полярности проводилось при концентрации ФС в растворе 15 μM . Поскольку, как известно, молекулы хлорина еб способны образовывать агрегаты, что может приводить к изменению фотофизических свойств ФС, дополнительно были проведены эксперименты с разными концентрациями ФС в растворах. При исследовании влияния кислотности на свойства флуоресценции Радахлорина концентрация активных солей в растворах варьировалась от 0,587 μM до 587 μM .

Типичные экспериментальные время-разрешенные сигналы флуоресценции Радахлорина, зарегистрированные в растворах PBS при уровне pH=7,5

с разными концентрациями ФС в растворе представлены в логарифмическом масштабе на рисунке 3.1 (а). Препарат Радахлорин представляет собой водный щелочной ($\text{pH} \approx 9$) раствор и варьирование концентрации ФС в широком диапазоне приводило к изменению рН итоговых растворов, поэтому уровень рН для каждой концентрации корректировался до уровня 7,5. Как видно из рисунка 3.1 (а), временные профили затухания флуоресценции Радахлорина не зависят от концентрации ФС в растворе, при этом среднее время затухания флуоресценции τ_{fl} составило $4,02 \pm 0,15$ нс. Стоит отметить, что регистрируемые кривые являются одноэкспоненциальными зависимостями, и наблюдаемое время затухания флуоресценции не зависит от концентрации ФС, что позволяет предполагать, что агрегирование не влияет на параметры флуоресценции в выделяемом спектральном диапазоне 601-682 нм. Время-разрешенные кривые флуоресценции, полученные при концентрации раствора Радахлорина $5,87 \mu\text{M}$ при изменении уровня кислотности (рН) представлены в логарифмическом масштабе на рисунке 3.1 (б). Как видно, при всех исследуемых значениях рН сигналы флуоресценции ФС также являются одноэкспоненциальными, однако вычисленное в ходе анализа экспериментальных данных время затухания флуоресценции Радахлорина (τ_{fl}) изменяется в зависимости от рН раствора. Зависимость τ_{fl} от уровня кислотности представлена на рисунке 3.2 (а). Видно, что зависимость τ_{fl} от рН раствора сильно нелинейна, наиболее быстрые изменения τ_{fl} происходят в диапазоне рН 5-7 и достигают плато на значениях около $3,15 \pm 0,15$ нс и $4,1 \pm 0,15$ нс при рН менее 5 и более 7, соответственно.

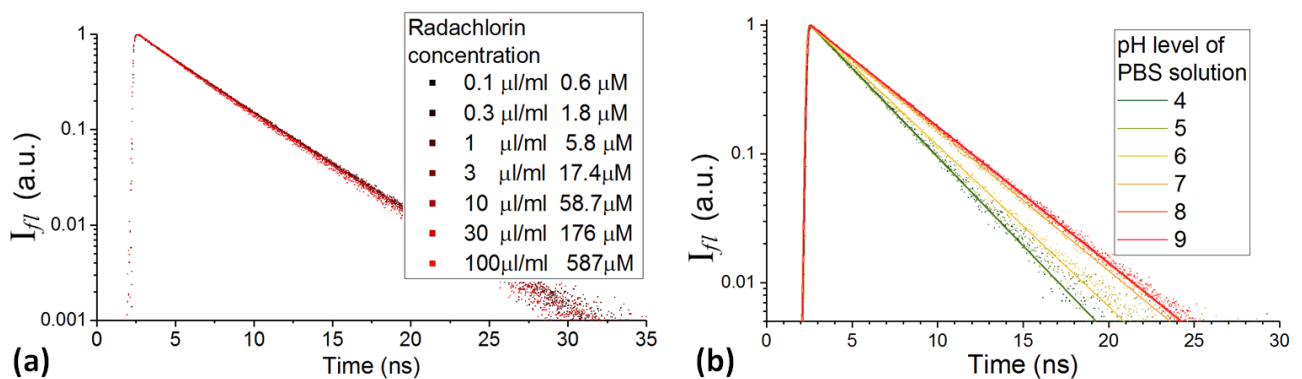


Рисунок 3.1 — Примеры экспериментальных сигналов флуоресценции Радахлорина с временным разрешением (точки) и результат подгонки сигналов одноэкспоненциальными функциями (сплошные линии, $\chi^2 < 1.2$) при (а) различных концентрациях ФС в растворе ($\text{pH} = 7.5$) и (б) при концентрации ФС $5,87 \mu\text{M}$ в растворах с разным рН.

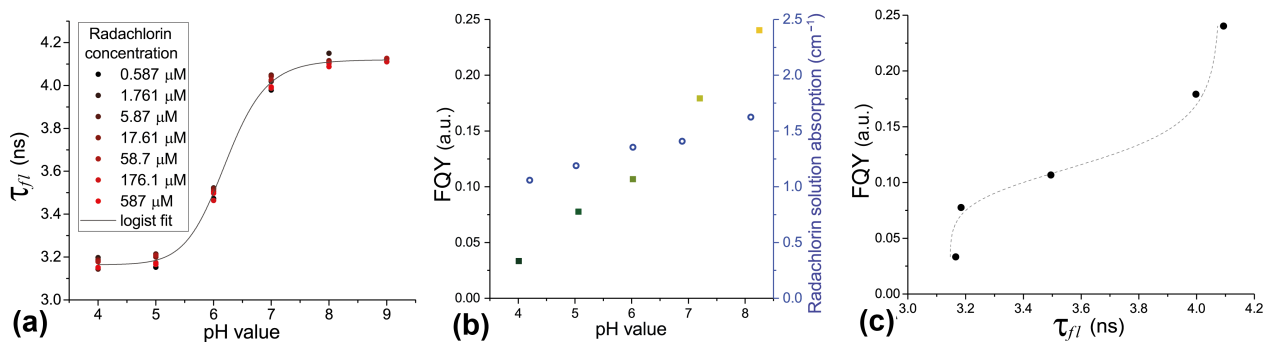


Рисунок 3.2 — (а) Зависимость времени затухания флуоресценции Радахлорина τ_{fl} при разных концентрациях ФС в растворах с разными рН. (b) Относительный квантовый выход флуоресценции (FQY) и поглощение раствора Радахлорина в зависимости от рН. (c) Относительный квантовый выход флуоресценции (FQY) Радахлорина как функция наблюдаемого времени затухания флуоресценции τ_{fl} . Экспериментальные погрешности измерения τ_{fl} и FQY равны $\pm 0,15$ нс и 0,04 а.у., соответственно

На основе анализа экспериментальных время-разрешенных сигналов флуоресценции была получена зависимость относительного квантового выхода флуоресценции Радахлорина (FQY), рассчитанного как отношение интенсивности флуоресценции к интенсивности поглощенного света, от кислотности раствора. Коэффициент поглощения Радахлорина в растворах PBS был вычислен из экспериментальных данных, полученных в ходе измерения изменения плотности мощности излучения, прошедшего через кварцевую кювету с раствором без и с Радахлорином при одинаковых значениях рН. Зависимость коэффициента поглощения Радахлорина от рН раствора показана на рисунке 3.2 (b) (голубые окружности, правая шкала). Полученная зависимость относительного квантового выхода флуоресценции (FQY) Радахлорина представлена на рисунке 3.2 (b) (цветные квадраты, левая шкала). Как можно видеть, оба параметра монотонно растут с увеличением рН. Стоит отметить, что FQY Радахлорина увеличивается в 10 раз в диапазоне рН 4-8, что является важным фактом, так как интенсивность флуоресценции ФС в ряде случаев используется для оценки накопления молекул ФС, однако, как видно из полученных результатов, кислотность микроокружения существенно влияет на квантовый выход флуоресценции Радахлорина. При этом оценить уровень рН можно по изменению времени затухания флуоресценции ФС, как было показано ранее. Проанализировав совместно данные на рис. 3.2 (a) и (b), можно получить соотношение относи-

тельного квантового выхода и времени затухания флуоресценции Радахлорина, обусловленное изменением рН раствора (рис. 3.2(c)). Полученное соотношение FQY и τ_{fl} является важным результатом и может быть использовано для оценки относительного квантового выхода флуоресценции, например в клетках, путем экспериментального измерения времен затухания флуоресценции ФС, в предположении, что внутриклеточный рН является основным фактором, влияющим на изменение времени затухания флуоресценции.

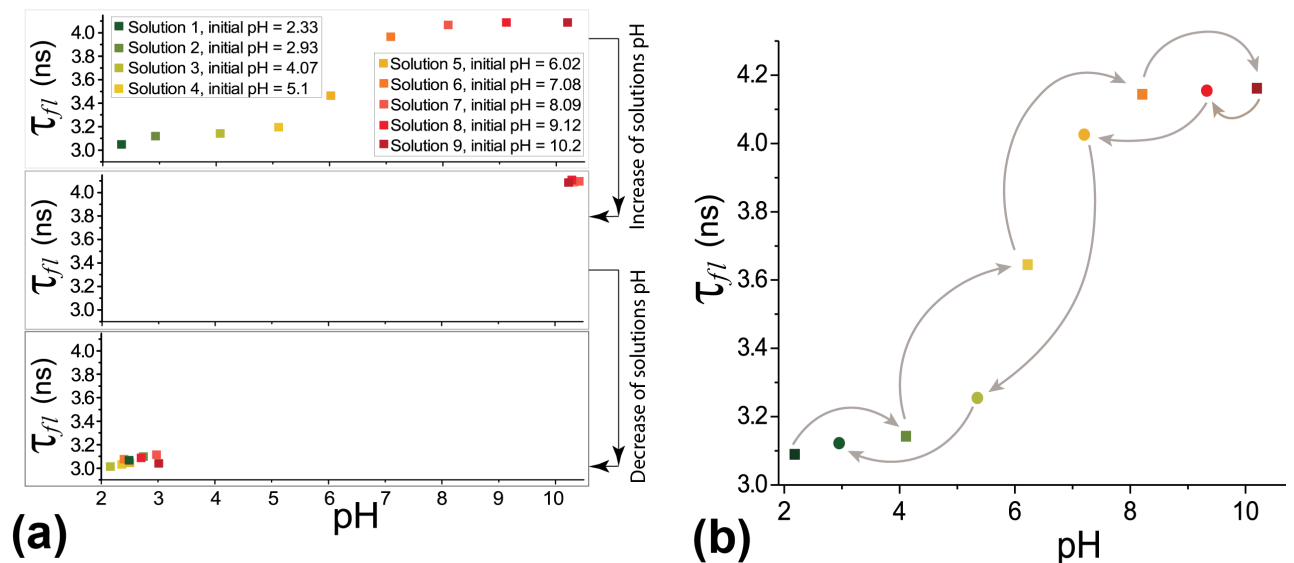


Рисунок 3.3 — (а) Демонстрация обратимости τ_{fl} с изменением рН; (б) Время затухания флуоресценции Радахлорина в растворе PBS при последовательном повышении рН раствора от 2,2 до 10,2, а затем уменьшении до 3,0 с шагом $\Delta(\text{pH}) \approx 2$. Погрешность измерения τ_{fl} равна $\pm 0,15$ нс.

Кроме того, было обнаружено, что изменения τ_{fl} в зависимости от рН раствора обратимы. Были проведены 2 типа контрольных экспериментов, в ходе которых: (1) рН растворов Радахлорина с разным уровнем кислотности сначала повышали примерно до $\text{pH} \approx 10$, а затем снижали до $\text{pH} \approx 3$ (рис. 3.3 (а)) и (2) проводили пошаговое изменение рН одного и того же раствора Радахлорина (рис. 3.3 (б)). В ходе первого эксперимента сначала (верхний ряд рис. 3.3 (а)) было измерено τ_{fl} 9 растворов Радахлорина с различными значениями рН, далее (средний ряд рис. 3.3 (а)) значения рН всех этих растворов увеличивали примерно до 10 и снова измеряли τ_{fl} флуоресценции Радахлорина. Как можно видеть, τ_{fl} во всех образцах увеличился примерно до 4,1 нс. После этого (нижний ряд рис. 3.3 (а)) рН всех растворов был снижен примерно до 2-3, измеренное время затухания флуоресценции τ_{fl} уменьшилось примерно до 3-3,1 нс. Следо-

вательно, изменение рН раствора приводит к обратимым изменениям времени затухания флуоресценции. Такое же обратимое поведение τ_{fl} в зависимости от рН раствора наблюдалось в ходе второго эксперимента при поэтапном изменении рН одного и того же раствора, см. рис. 3.3 (b). Постепенное повышение рН от 2 до 10 с шагом 2 и дальнейшее снижение до рН=3 обеспечивало ту же зависимость, что и на рис. 3.2 (a).

На следующем этапе работ были проведены эксперименты по исследованию параметров флуоресценции ФС в зависимости от полярности растворителя. Флуоресценция Радахлорина исследовалась в водных растворах этанола и метанола, в которых изменение концентрации спирта приводило к изменению полярности раствора. В ходе экспериментов наблюдались значительные изменения квантового выхода и времени затухания флуоресценции Радахлорина при изменении концентрации этанола/метанола в растворе (см. рисунок 3.4). Увеличение концентрации спирта приводило к уменьшению полярности раствора (диэлектрическая проницаемость воды равна 80, в то время как диэлектрические проницаемости метанола и этанола равны 33 и 25 соответственно [194]). Как хорошо видно из рисунка 3.4 (a), при концентрации спирта около 50% происходит увеличение относительного квантового выхода флуоресценции Радахлорина примерно в два раза, за которым следует плато. Стоит отметить, что не наблюдалось никакой разницы в FQY Радахлорина в растворах этанола и метанола (рис. 3.4 (a)).

В свою очередь, время затухания флуоресценции τ_{fl} нелинейно увеличивается с концентрацией спирта вплоть до 60-65% , а при более высоких концентрациях выходит на плато. При этом было обнаружено, что время затухания флуоресценции в растворах этанола ниже, чем в растворах метанола, характеризующегося большей полярностью по сравнению с этанолом. В частности, τ_{fl} увеличилось с 3,5 нс в водном растворе Радахлорина (рН=6,2) примерно до 4,3 нс в EtOH и до 4,6 нс в MeOH (рис. 3.4 (b)). Стоит отметить, что при изменении концентрации спиртов в растворах менялась не только полярность, но и вязкость микроокружения. Однако, в общем случае время затухания флуоресценции флуорофоров не зависит от вязкости растворителя, за исключением для особых типов - молекулярных ротор. Вместе с тем, вязкость водно-спиртовых растворов изменяется нелинейно (см. рис. 3.12, b) и не коррелирует с наблюдаемым изменением времени затухания флуоресценции Радахлорина (см. рис 3.4,

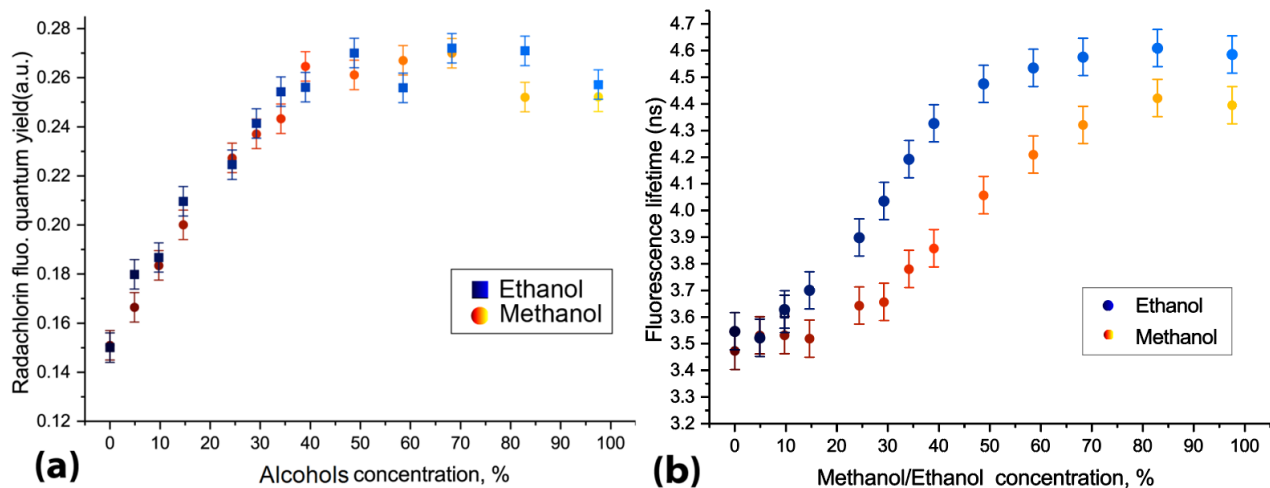


Рисунок 3.4 — (a) Относительный квантовый выход флуоресценции Радахлорина в зависимости от концентрации спирта в растворе. (b) Время затухания флуоресценции (τ_{fl}) Радахлорина в зависимости от концентрации спирта при одно- и двухфотонном возбуждении на 405 и 810 нм.

b), что позволяет связывать изменение τ_{fl} времени затухания флуоресценции Радахлорина именно с изменением полярности, которая может влиять на безызлучательные пути релаксации возбужденной молекулы фотосенсибилизатора.

Нелинейные зависимости времени затухания флуоресценции τ_{fl} , представленные на рисунках 3.2 (a) и 3.4 (b), могут быть обусловлены одновременным существованием нескольких форм компонентов Радахлорина с разными физическими и химическими свойствами, зависящими от pH раствора или полярности. Как известно, компоненты Радахлорина, хлорин е6, хлорин р6 и пурпурин 5 являются производными порфирина, содержащими ионизуемые карбоксильные группы и пиррольные азотистые соединения (см. рис. 1.3), которые позволяют этим молекулам существовать в разных ионных формах с разным зарядом в зависимости от окружающей среды [17; 195]. Изменения распределения молекулярного заряда и межмолекулярного электростатического поля могут сильно влиять на вероятность безызлучательных релаксационных переходов в молекулах (см. уравнение 1.1) [196], что приводит к нелинейному изменению наблюдаемого τ_{fl} в зависимости от pH и полярности раствора.

Помимо наблюдаемого уменьшения времени затухания флуоресценции τ_{fl} и FQY, уменьшение pH раствора приводило к смещению максимумов полос поглощения Sore и Q(IV) в красную область и смещению полосы Q(I) в синюю область (рис. 3.5(a)). Представленные спектры поглощения и флуоресценции

Радахлорина в растворах PBS с разными значениями pH и в водно-спиртовых растворах были получены с помощью спектрофотометра UV-3600 UV-VIS-NIR Spectrophotometer (Shimadzu, Япония) и спектрофлуориметра Fluoromax-4P spectrofluorometer (Horiba, Япония).

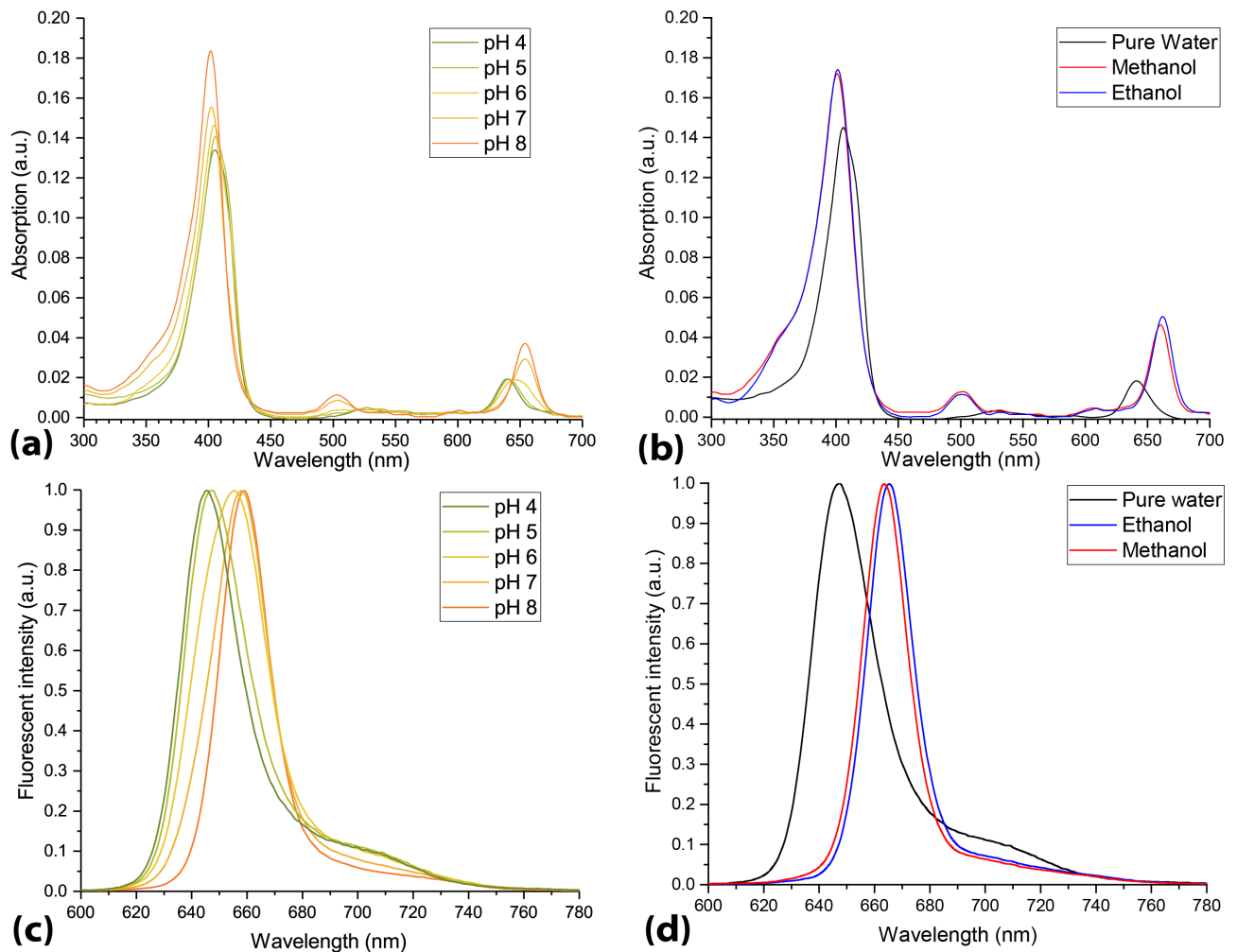


Рисунок 3.5 — Спектры поглощения (a, b) и флуоресценции (c, d) Радахлорина в растворах PBS с разными значениями pH (a,c), и в водно-спиртовых растворах (b,d).

В свою очередь, пик флуоресценции Радахлорина смещался в коротковолновую область с уменьшением значения pH раствора (рис. 3.5(c)). Аналогичные изменения спектров поглощения и флуоресценции хлорина еб в зависимости от pH раствора наблюдались ранее и предполагалось, что данная зависимость обусловлена протонированием карбоксильных групп и пиррольных азотистых соединений молекулы в кислой среде и их депротонированием в щелочной [17; 197]. При этом, уменьшение отрицательного заряда при кислом pH вызывает повышенную гидрофобность и способствует агрегации молекул ФС.

В растворах как метанола, так и этанола наблюдался существенный сдвиг максимума поглощения $Q(I)$ и пика флуоресценции в длинноволновую область спектра, а также увеличение общего поглощения молекул ФС (рис. 3.5(b,d)). Наблюдаемое длинноволновое смещение максимума флуоресценции Радахлорина в спиртовых растворах по сравнению с водным раствором свидетельствует об увеличении дипольного момента молекул ФС при возбуждении в этих растворителях [198].

Таким образом, мы показали, что параметры флуоресценции (τ_{fl} и FQY) ФС Радахлорин существенно зависят как от кислотности, так и от полярности растворителя. Полученные в данном разделе результаты были использованы для анализа данных, полученных в ходе исследования свойств флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде (раздел 3.4).

3.2 Определение параметров время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого с помощью фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах разной кислотности и полярности

Исследование флуоресценции ФС Радахлорин в растворах разной кислотности и полярности сопровождалось изучением время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода в таких же условиях. Времена генерации и жизни синглетного кислорода (СК), а также его относительный квантовый выход (SOQY) в водных растворах разной кислотности (pH) и в водно-спиртовых растворах разной полярности оценивали путем регистрации сигналов фосфоресценции СК с временным разрешением. Используемая экспериментальная установка аналогична изображенной на рисунке 2.5 в разделе 2.2, где вместо исследуемой поверхности была установлена кварцевая кювета с исследуемым раствором.

Для возбуждения молекул Радахлорина использовался лазер, излучающий на длине волны 405 нм с длительностью импульса 100 нс и частотой следования импульсов 80 кГц. Для детектирования сигналов фосфоресценции СК использовался фотоумножитель (ФЭУ) NIR PMT H10330B-45 (Hamamatsu), ра-

ботающий в режиме счета фотонов. Сигнал с ФЭУ обрабатывался модулем TCSPC PicoHarp 300 (PicoQuant) для регистрации время-разрешенных сигналов флуоресценции СК. Сигнал флуоресценции СК спектрально выделялся в диапазоне 1269-1279 нм, соответствующем максимуму полосы люминесценции СК, с помощью монохроматора МДР-12 (ЛОМО). Сигналы флуоресценции СК собирались в течение 600 с с временным разрешением 512 пс. Типичные сигналы флуоресценции СК в растворах PBS с разными значениями pH и в водно-спиртовых растворах разной полярности представлены на рисунке 3.6.

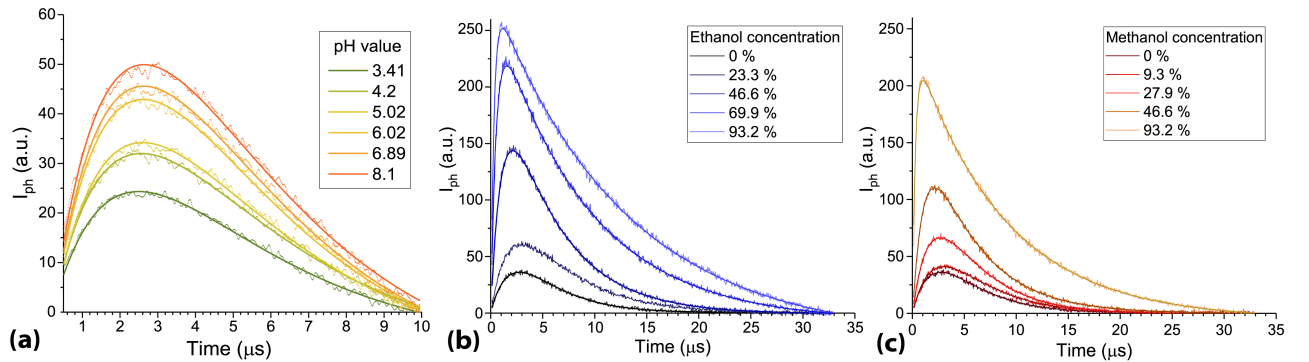


Рисунок 3.6 — Время-разрешенные сигналы флуоресценции СК (I_{ph}), генерируемого с помощью Радахлорина в растворах PBS с разными значениями pH (a) и в водных растворах этанола (b) и метанола (c).

Из экспериментальных сигналов были определены интенсивности флуоресценции СК в разных растворах путем интегрирования площади под время-разрешенными сигналами СК с учетом темнового шума и рассеянного света. На основе этих данных был рассчитан относительный квантовый выход синглетного кислорода (SOQY) с учетом определенных ранее коэффициентов поглощения растворов. Результаты вычисления SOQY в исследуемых растворах представлены на рисунке 3.7.

В ходе анализа экспериментальных данных были определены времена жизни и генерации СК в разных условиях при подгонке регистрируемых сигналов двухэкспоненциальной функцией:

$$I_{ph}(t) = \frac{\Phi}{\tau_1 - \tau_2} \left[e^{-\frac{t}{\tau_1}} - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right] \quad (3.1)$$

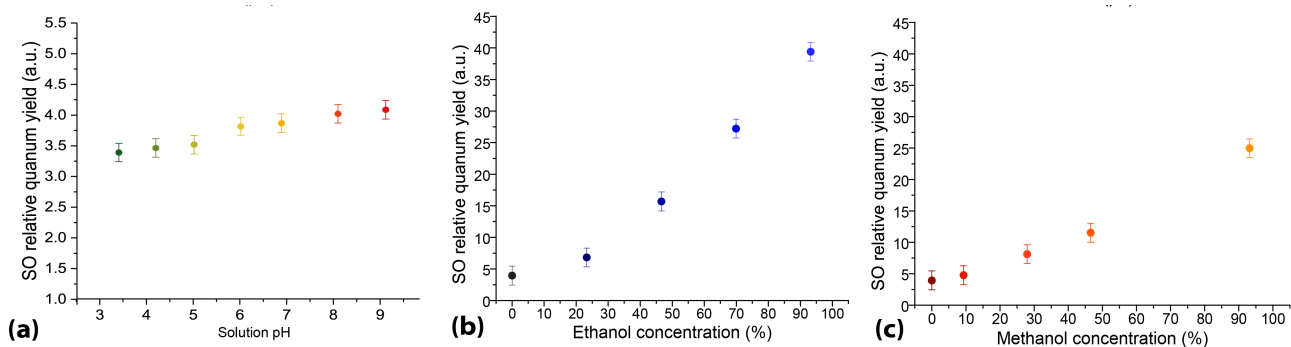


Рисунок 3.7 — Относительный квантовый выход фосфоресценции СК, генерируемого с помощью Радахлорина в растворах PBS с различными значениями рН (а) и в водных растворах этанола (b) и метанола (с).

где τ_1 и τ_2 – времена генерации и жизни синглетного кислорода, Φ - площадь под время-разрешенной кривой фосфоресценции СК, которая пропорциональна квантовому выходу СК.

Результаты обработки экспериментальных данных и определения времен жизни и генерации СК в растворах разной кислотности и полярности представлены на рисунке 3.8.

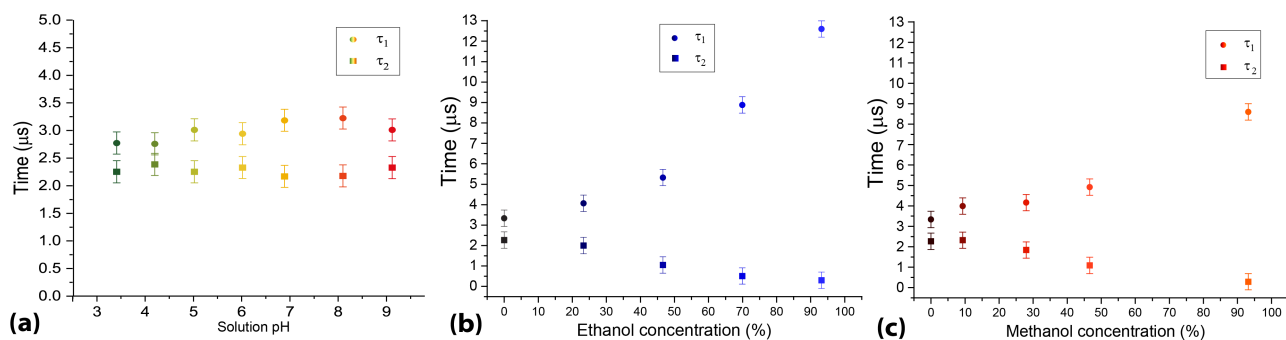


Рисунок 3.8 — Времена генерации и жизни СК, генерируемого с помощью Радахлорина в растворах PBS с разными значениями рН (а) и в водных растворах этанола (b) и метанола (с).

Несмотря на значительные изменения параметров флуоресценции Радахлорина - относительного квантового выхода (FQY) и времени затухания - в зависимости от рН раствора (см. рисунок 3.2 в разделе 3.1), относительный квантовый выход фосфоресценции СК (SOQY) почти не изменяется с изменением кислотности раствора, как это можно видеть на рисунке 3.7. Незначительные изменения SOQY на рисунке 3.7 (а) находится в пределах относительно больших экспериментальных погрешностей в условиях низкого отношения сигнал/шум сигнала фосфоресценции СК. Также, как видно из рисунка 3.8 (а),

не наблюдалось статистически значимых изменений времен генерации и жизни фосфоресценции СК в зависимости от рН.

Наоборот, изменение полярности растворителя в водно-спиртовых растворах приводило не только к изменению свойств флуоресценции Радахлорина (см. раздел 3.1), но и к изменению как относительного квантового выхода СК (SOQY), так и характерных времен сигнала его фосфоресценции. Зарегистрированные сигналы фосфоресценции СК с временным разрешением в водно-спиртовых растворах показаны на рисунке 3.6 (b, c). Относительные квантовые выходы, времена жизни и генерации СК в зависимости от концентрации спиртов показаны на рисунках 3.7 (b),(c) и 3.8 (b),(c), соответственно.

Увеличение концентрации спирта в растворе сопровождается уменьшением полярности раствора и к значительному увеличению количества генерируемого синглетного кислорода (SOQY), примерно в 10 раз в этаноле и в 6 раз в метаноле (рис. 3.7 (b) и (c)). В то же время увеличение концентрации спирта приводит к значительным изменениям обоих характерных времен сигнала фосфоресценции СК τ_1 и τ_2 . Так, наблюдалось уменьшение времени генерации СК τ_2 и увеличение времени жизни τ_1 (рис. 3.8 (b) и (c)). В то время как изменения τ_2 , вызванные увеличением концентрации этанола и метанола, были примерно одинаковыми, изменения τ_1 более выражены в растворах этанола. Полученные результаты свидетельствуют о том, что микроокружение молекул Радахлорина может существенно влиять не только на их фотофизические свойства, но и на генерацию синглетного кислорода и, возможно, других активных форм кислорода. Наблюдаемый значительный рост SOQY, а также резкие изменения времен τ_1 и τ_2 с увеличением доли спирта в смесях вода/этанол и вода/метанол могут быть объяснены увеличением константы скорости радиационного перехода из возбужденного синглетного состояния молекулы кислорода в основное состояние от $0,16 \text{ сек}^{-1}$ в воде до $0,42 \text{ сек}^{-1}$ в метаноле и $0,5 \text{ сек}^{-1}$ в этаноле, как это было показано в работе [199]. Значительное повышение квантового выхода СК в менее полярных растворителях (метаноле и этаноле) с низкой диэлектрической проницаемостью (в 2,4 и 3,2 раза ниже, чем у воды, соответственно) следует учитывать при оценке образования СК в клетках и тканях, поскольку внутри- и внеклеточные значения полярности могут заметно различаться [194].

3.3 Анизотропия флуоресценции и время вращательной диффузии фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах разной кислотности, вязкости и полярности при одно- и двухфотонном возбуждении

Информацию о микроокружении флуорофора можно получить с помощью анализа время-разрешенных компонент поляризованной флуоресценции (анизотропии флуоресценции). В частности, такие параметры как время вращательной диффузии (τ_{rot}) и параметр анизотропии r_0 , который характеризуется углом θ между дипольными моментами переходов возбуждения и флуоресценции, позволяют сделать выводы о связывании молекул, изменении их конформаций, а также вязкости микроокружения [200]. Несмотря на широкое применение время-разрешенной флуоресцентной анизотропной спектроскопии, исследование ФС Радахлорин и его основного компонента хлорина еб в растворах с разными условиями микроокружения данным методом не проводилось как при одно-, так и при двухфотонном возбуждении, обеспечивающим большую оптическую селекцию молекул при возбуждении. В данном разделе представлены результаты исследования влияния режима и длины волны возбуждения на анизотропию флуоресценции Радахлорина в водных и водно-спиртовых растворах, а также экспериментально определены анизотропия и время вращательной диффузии в растворах разной вязкости и кислотности.

Исследование параметров время-разрешенных сигналов поляризованной флуоресценции Радахлорина в растворах проводилось с помощью оптической установки, схема которой представлена на рисунке 3.9. Фемтосекундный Ti:Sa лазер Mai-Tai HP DS (Spectra Physics), перестраиваемый в спектральном диапазоне 690-1040 нм, с длительностью импульса 100 фс и частотой следования импульсов 80,4 МГц использовался в качестве источника возбуждающего излучения. Флуоресценция Радахлорина возбуждалась в полосе поглощения Core с максимумом около 405 нм (см. рисунок 1.4) в условиях однофотонного (ОРЕ) и двухфотонного (ТРЕ) возбуждения в диапазонах длин волн 375-420 нм и 750-840 нм, соответственно, с шагом изменения длины волны не более 5 нм. Лазерный луч в схеме ОРЕ был получен путем удвоения частоты основного выходного сигнала лазера генератором второй гармоники Inspire Blue (Spectra Physics). Плотность мощности лазерного импульса в фокальной области образ-

ца поддерживалась на уровне $0,2 \text{ МВт/см}^2$ в режиме ОРЕ и 795 МВт/см^2 в режиме ТРЕ. Степень линейной поляризации возбуждающего света была выше $0,995$, а направление поляризации регулировалось пластиной $\lambda/2$. Лазерный луч фокусировался в центр кварцевой кюветы с раствором ФС, а сигнал флуоресценции Радахлорина собирали в направлении, перпендикулярном лазерному лучу. Ортогонально поляризованные компоненты флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} разделялись призмой Глана и регистрировались двумя сверхбыстрыми фотоприемниками SPAD PD-050-СТС (MPD). Сигнал флуоресценции спектрально выделялся при помощи полосового фильтра ВР645/75. В режиме ТРЕ рассеянное возбуждающее лазерное излучение отсекалось от сигнала флуоресценции фильтром SP700 (Chroma), а в режиме ОРЕ оно блокировалось фильтром LP470 (Chroma). Сигналы флуоресценции Радахлорина, накопленные в течение 3 минут с временным интервалом 4 пс в режиме счета фотонов, анализировались системой TCSPC PicoHarp 300 (PicoQuant).

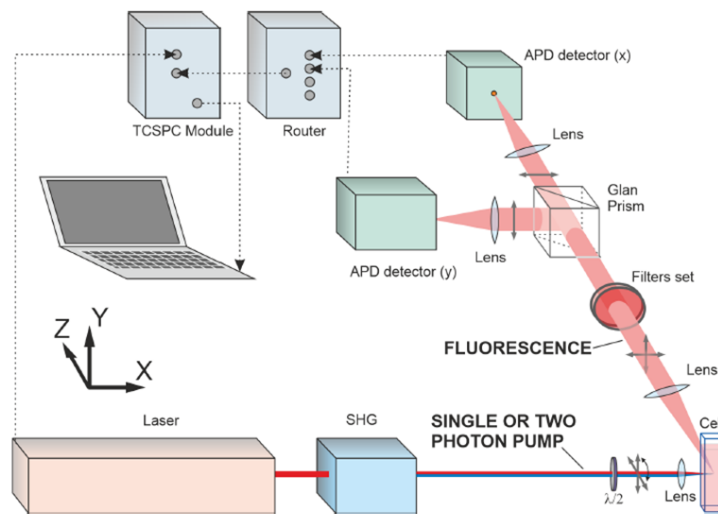


Рисунок 3.9 — Схема экспериментальной установки для исследования анизотропии флуоресценции и времен вращательной диффузии.

Зарегистрированные ортогональные компоненты I_{\parallel} и I_{\perp} сигналов флуоресценции ФС Радахлорин с временным разрешением использовались для вычисления параметра начальной анизотропии r_0 и времен вращательной диффузии τ_{rot} . Обработка сигналов выполнялась с помощью процедуры глобального фитинга с использованием выражений [123]:

$$\begin{aligned}
I_{\parallel} &= G \int_0^t IRF(t')I(t-t')[1+2r(t-t')]dt \\
I_{\perp} &= G \int_0^t IRF(t')I(t-t')[1-r(t-t')]dt
\end{aligned}
\tag{3.2}$$

где $I(t)$ - изотропная часть сигнала затухания флуоресценции, $r(t)$ - анизотропия флуоресценции, $IRF(t)$ - функция отклика детекторов, а G - отношение чувствительности детекторов в двух каналах регистрации сигналов. Параметр G и функция отклика детекторов $IRF(t)$ были предварительно определены коллегами из ФТИ института им. А.Ф. Иоффе в ходе дополнительных экспериментов для используемой в работе установки [123]. Изотропная часть флуоресценции Радахлорина $I(t)$ исследовалась ранее неполяризованными методами в разных условиях микроокружения, как было показано в предыдущем разделе 3.1. Было показано, что $I(t)$ имеет одноэкспоненциальную форму затухания с временем затухания флуоресценции τ_{fl} , изменяющимся в диапазоне 3-4,5 нс при разных условиях кислотности и полярности. При этом $I(t)$ в уравнении 3.2 принимает вид:

$$I(t-t') = I_0 \cdot e^{-\frac{t-t'}{\tau_{fl}}} \tag{3.3}$$

Таким образом, в данном разделе приведены результаты исследования именно анизотропной компоненты флуоресценции Радахлорина $r(t)$ в разных условиях микроокружения ФС. Как упоминалось ранее в разделе 1.3, параметр анизотропии может изменяться со временем $r(t)$ и рассчитывается из ортогональных компонент сигнала флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} как [201]:

$$r(t) = \frac{\frac{1}{G}I(t)_{\parallel} - I(t)_{\perp}}{\frac{1}{G}I(t)_{\parallel} + 2I(t)_{\perp}} \tag{3.4}$$

Исследование время-разрешенных компонент поляризованной флуоресценции Радахлорина проводилось в водных растворах фосфатного буфера (PBS) разной кислотности и в водно-спиртовых растворах этанола и метанола, что приводило к изменению как полярности растворителя, так и вязкости исследуемой системы. Также, как и в предыдущих разделах, уровень pH варьи-

ровался в диапазоне 3-10 и изменялся добавлением небольших количеств HCl и КОН. Исследование анизотропии флуоресценции и времен вращательной диффузии Радахлорина в растворах проводилось при концентрации 15 μM и 30 μM для одно- (ОРЕ) и двух-фотонного (ТРЕ) режимов возбуждения.

Типичные время-разрешенные сигналы затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} Радахлорина в воде, полученные в режимах ОРЕ и ТРЕ с возбуждением на длине волны 405 нм, представлены на рисунке 3.10 (а) и (б), соответственно. Зависимость от времени параметра анизотропии флуоресценции Радахлорина, рассчитанной с использованием уравнения 3.4, показана на рисунке 3.10 (с) для ОРЕ и ТРЕ синим и красным цветом, соответственно.

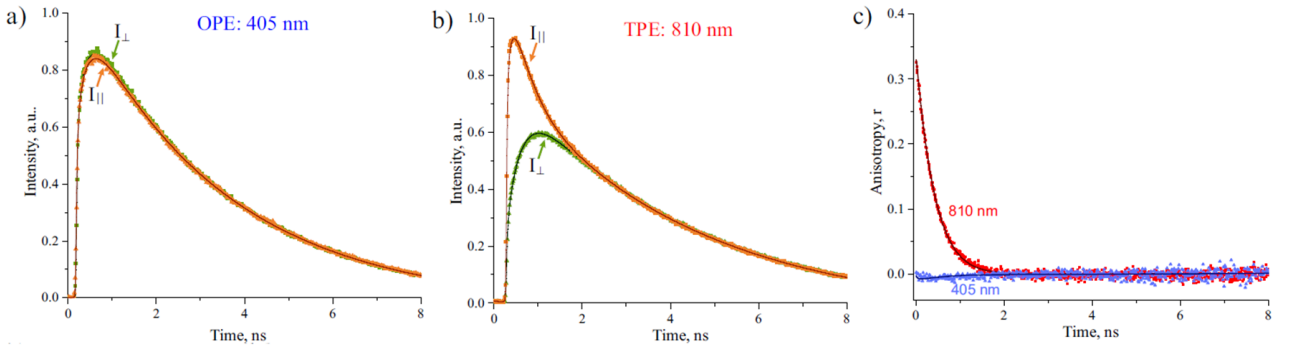


Рисунок 3.10 — Время-разрешенные сигналы ортогонально поляризованных компонент флуоресценции Радахлорина в воде при: (а) ОРЕ при возбуждении на 405 нм и (б) ТРЕ при возбуждении на 810 нм. (с) Сигналы затухания анизотропии $r(t)$, рассчитанные из I_{\parallel} и I_{\perp} с использованием уравнения 3.4.

В условиях проводимых экспериментов изменение анизотропии со временем (см рисунок 3.10 (с)) обусловлено эффектом вращательной диффузии и динамику изменения анизотропии $r(t)$ можно представить в одноэкспоненциальной форме:

$$r(t) = r_0^{(n)} e^{-\frac{t}{\tau_{rot}}}, \quad (3.5)$$

где $r_0^{(n)}$ - параметр начальной анизотропии флуоресценции (в момент возбуждения), индекс n , равный 1 или 2, обозначает возбуждение в одно- (ОРЕ) и двухфотонном (ТРЕ) режиме, а τ_{rot} - время вращательной диффузии молекулы ФС.

Вначале было проведено исследование анизотропии ФС при разных длинах волн возбуждения в пределах полосы Core при одно- и двухфотонном ре-

жимах для оценки экспериментальных параметров, которые могут быть использованы для проведения последующих экспериментов и определения локальной вязкости в растворах и во внутриклеточной среде. Исследования влияния режима и длины волны возбуждения проводились на растворах Радахлорина в воде и в 40% смеси метанола и воды. Параметры поляризованной флуоресценции Радахлорина в водном и в 40% водно-метанольном растворе, полученные в ходе анализа экспериментальных данных и подгонке зависимостей анизотропии флуоресценции одноэкспоненциальной функцией 3.5, представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Параметры флуоресценции Радахлорина при одно- (ОРЕ) и двухфотонном (ТРЕ) возбуждении на длине волны 405 нм и 810 нм в водном и 40% водно-спиртовом растворах

	Вода		40% MeOH	
	ОРЕ, 405 нм	ТРЕ, 810 нм	ОРЕ, 405 нм	ТРЕ, 810 нм
$\tau_{fl} \pm 0.35$, нс	3.3	3.5	3.5	3.8
$\tau_{rot} \pm 0.07$, нс	0.32	0.24	0.44	0.34
$r_0 \pm 0.02$	-0.03	0.35	-0.02	0.39

В ходе анализа экспериментальных сигналов было получено для водного и 40% водно-метанольного растворов Радахлорина время затухания τ_{fl} изотропной части флуоресценции $I(t)$ (см. уравнение 3.3), время вращательной диффузии τ_{rot} и параметр начальной анизотропии r_0 (см. уравнение 3.5) для возбуждения в режиме ОРЕ и ТРЕ, полученные значения представлены в таблице 3. Стоит отметить, что время затухания флуоресценции τ_{fl} для обоих режимов возбуждения были получены одинаковыми в одном и том же растворе в пределах экспериментальных погрешностей, но для водно-метанольного раствора τ_{fl} больше на 0,03 нс, чем в воде, как и было ранее получено в разделе 3.1 при исследовании τ_{fl} неполяризованными методами.

Время вращательной диффузии τ_{rot} в воде оказалось несколько короче, чем в водно-метанольном растворе, что согласуется с различием вязкости растворителей и будет обсуждаться ниже при рассмотрении соотношения Эйнштейна-Стокса (уравнение 3.11). Кроме того, время вращательной диффузии τ_{rot} , полученных в режиме ТРЕ немного короче, чем при однофотонном возбуждении (см. таблицу 3). Наблюдаемая разница в значениях τ_{rot} может быть обусловлена локальным изменением температуры раствора в фокальной области при однофотонном и двухфотонном режимах поглощения. Так, плотность

мощности лазерного излучения, используемого для ТРЕ, была примерно в 4000 раз выше, чем для режима ОРЕ. Несмотря на то, что отношение поперечных сечений поглощения для ТРЕ и ОРЕ было небольшим, примерно 10^{-4} , можно предположить, что локальная температура раствора была выше в случае ТРЕ, что могло привести к уменьшению локальной вязкости раствора и несколько меньшему наблюдаемому времени вращательной диффузии.

Результаты, представленные на рисунке 3.10 и в таблице 3, демонстрируют резкое различие значений параметра начальной анизотропии (r_0) флуоресценции, полученных в режимах ОРЕ и ТРЕ. Видно, что в случае ТРЕ значение начальной анизотропии флуоресценции Радахлорина в воде $r_0^{(2)}=0,35$, в то время как в случае возбуждения в режиме ОРЕ значение $r_0^{(1)}$ оказалось довольно низким и отрицательным: $r_0^{(2)} \approx -0,03$. Для водно-метанольного раствора Радахлорина значения анизотропии флуоресценции в начальный момент времени составили $r_0^{(2)}=0,39$ и $r_0^{(1)}=-0,02$ для ТРЕ и ОРЕ, соответственно.

Обнаруженное существенное различие значений параметра анизотропии в начальный момент времени r_0 при ОРЕ и ТРЕ было исследовано далее в рамках экспериментов при изменении длины волны возбуждения и параметров раствора. Сначала, в 40% водно-метанольном растворе, для которого наблюдалось более медленное фотообесцвечивание ФС, анизотропия в начальный момент времени была проанализирована как функция от длины волны возбуждения в полосе поглощения Соре при одно- ($r_0^{(1)}$) и двухфотонном ($r_0^{(2)}$) возбуждении. Полученные данные представлены на рисунке 3.11 (а), где сплошной линией также изображен спектр поглощения раствора Радахлорина в спектральном диапазоне 370-430 нм. Как видно из рисунка 3.11 (а), параметр анизотропии r_0 , полученный в режимах ОРЕ и ТРЕ, резко изменяется в спектральном диапазоне 370-430 нм. В случае ОРЕ параметр анизотропии $r_0^{(1)}$ имеет небольшое отрицательное, почти нулевое значение вблизи максимума полосы поглощения Соре при 405 нм и значительно увеличивается при смещении как в длинноволновое, так и коротковолновое крыло полосы поглощения. В случае двухфотонного возбуждения параметр $r_0^{(2)}$ имеет максимум $\approx 0,43$ при длине волны около 395 нм и плавно уменьшается при изменении длины волны возбуждения в обе стороны спектра. Стоит отметить, что в области спектра поглощения 420 нм параметр начальной анизотропии r_0^n становится практически одинаковым для обоих режимов ОРЕ и ТРЕ.

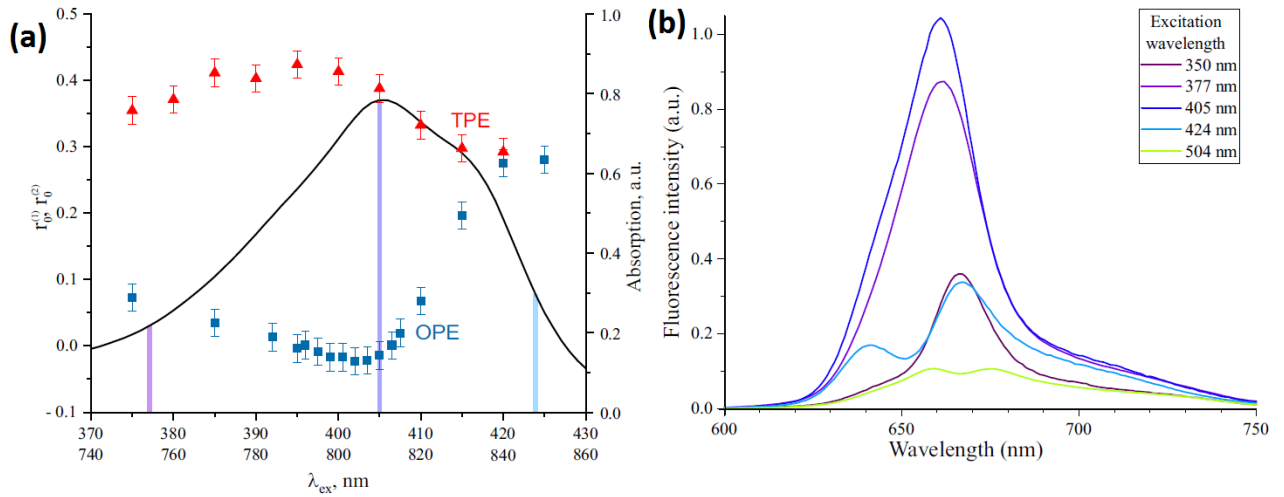


Рисунок 3.11 — (а) Начальная анизотропия флуоресценции $r_0^{(1)}$ и $r_0^{(2)}$ Радахлорина в 40% МеОН в зависимости от длины волны возбуждения в режимах ОРЕ и ТРЕ. Спектр однофотонного поглощения в полосе Core показан черной кривой. (б) Спектры флуоресценции Радахлорина в 40% растворе МеОН при возбуждении на разных длинах волн

Резкое различие в параметрах анизотропии флуоресценции, полученных при ОРЕ и ТРЕ, показанное на рисунке 3.11 (а) и в таблице 3, может быть объяснено с помощью выражений, описывающих угловые зависимости параметров анизотропии в начальный момент времени. Известно, что в случае однофотонного возбуждения молекул типа симметричного волчка или плоских молекул с внутриплоскостными поляризованными переходами начальная анизотропия $r_0^{(1)}$ пропорциональна многочлену Лежандра второго порядка от косинуса угла θ между дипольными моментами переходов возбуждения и флуоресценции [120]:

$$r_0^{(1)} = \frac{2}{5}P_2(\cos \theta), \quad (3.6)$$

где θ - угол между дипольными моментами \mathbf{d}_{ab} и \mathbf{d}_{fl} переходов поглощения и флуоресценции, соответственно, а $P_2(\cos \theta)$ - многочлен Лежандра второго порядка.

Из приведенного выражения 3.6 для начального значения анизотропии при однофотонном возбуждении, параметр $r_0^{(1)}$ принимает значения от $2/5$ до $-1/5$ при изменении угла между дипольными моментами перехода поглощения и флуоресценции θ от 0 до $\pi/2$, соответственно, и обращается в ноль при $\theta \approx$

57 °. Стоит отметить, что экспериментально полученное значение анизотропии в начальный момент времени для однофотонного возбуждения Радахлорина на длине волны 405 нм близко к нулю (см. рисунок 3.11 (а) и таблицу 3), таким образом значения θ для исследуемой молекулы ФС около $\approx 57^\circ$.

В случае двухфотонного возбуждения двумя одинаковыми фотонами, параметр анизотропии флуоресценции $r_0^{(2)}$, в общем случае может быть представлен в виде [123; 202]:

$$r_0^{(2)} = \frac{2}{7} \left[\frac{3D}{Td_{fl}^2} - 1 \right], \quad (3.7)$$

где

$$D = 2\mathbf{d}_{fl} \cdot \mathbf{S}^2 \cdot \mathbf{d}_{fl} + (\mathbf{d}_{fl} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{d}) Tr \mathbf{S}, \quad (3.8)$$

и

$$T = Tr^2 \mathbf{S} + 2Tr \mathbf{S}^2, \quad (3.9)$$

где \mathbf{S} - тензор двухфотонного поглощения с компонентами S_{XX} , S_{YY} , S_{ZZ} относительно главных осей молекулы.

В общем случае при двухфотонном возбуждении, направление дипольного момента перехода флуоресценции \mathbf{d}_{fl} в уравнении 3.8 описывается двумя полярными углами θ_{FS} и ϕ_{FS} относительно главной оси тензора \mathbf{S} двухфотонного поглощения. Стоит отметить, что параметр начальной анизотропии флуоресценции $r_0^{(2)}$ в рассматриваемом случае имеет экстремальные значения $(1 \pm 3\sqrt{6/5})/7$, что было показано авторами работы [202]. При этом, в случае когда одна из компонент тензора двухфотонного поглощения \mathbf{S} намного больше других, например $S_{XX} \gg S_{YY}, S_{ZZ}$, параметр анизотропии флуоресценции $r_0^{(2)}$ в уравнении 3.7 может быть упрощен до вида [120; 123; 202]:

$$r_0^{(2)} = \frac{4}{7} P_2(\cos \theta_{FS}), \quad (3.10)$$

где $\theta \approx \theta_{FS}$. Тогда параметр $r_0^{(2)}$ в уравнении 3.10 варьируется от $4/7$ до $-2/7$, обращаясь в ноль при $\theta_{FS} \approx 57^\circ$.

Экспериментально полученная нами значительная разница параметров начальной анизотропии флуоресценции Радахлорина $r_0^{(1)}$ и $r_0^{(2)}$, показанная на рисунке 3.11 (а) и в таблице 3, позволяет предположить, что при двухфотонном возбуждении раствора Радахлорина приближение $S_{XX} \gg S_{YY}, S_{ZZ}$ является неверным для исследуемого ФС и выражение 3.10 не применимо для данного ФС. В этом случае принципиальная структура тензора двухфотонного поглощения \mathbf{S} может не иметь прямого отношения к дипольному моменту перехода однофотонного поглощения, а углы θ_{FS} и θ в данном случае различны [202]. Таким образом, для теоретической оценки значения $r_0^{(2)}$ следует использовать общее неосесимметричное выражение 3.7, а не его упрощенную форму, представленную в уравнении 3.10. Стоит отметить, что на настоящий момент не известны компоненты тензора двухфотонного поглощения \mathbf{S} для молекулы хлорина еб, а неосесимметричная форма уравнения 3.7 может приводить к различным значениям начальной анизотропии $r_0^{(2)}$ в режиме ТРЕ по сравнению со значениями $r_0^{(1)}$ для ОРЕ, что и было экспериментально показано на рисунке 3.11 (а).

Как известно из литературных данных, анизотропия флуоресценции часто изменяется в диапазоне спектра возбуждения [202; 203]. Полученная зависимость начальной анизотропии флуоресценции Радахлорина в 40% водно-метанольном растворе от длины волны возбуждения при разных режимах возбуждения, представленная на рисунке 3.11 (а), может быть рассмотрена в совокупности с анализом изменения спектров флуоресценции ФС 3.11 (b). Из полученных спектров флуоресценции Радахлорина видно, что в диапазоне 600-750 нм, в котором проводилась регистрация анизотропии флуоресценции, форма спектров значительно зависит от длины волны возбуждения, особенно при возбуждении в длинноволновой части полосы поглощения *Sore*, при котором наблюдалось резкое изменение параметра начальной анизотропии при режимах ОРЕ и ТРЕ, см. рисунок 3.11 (а). Таким образом, изменение начальной анизотропии $r_0^{(n)}$ Радахлорина с длиной волны возбуждения может быть обусловлено поглощением в различные возбужденные состояния или различными компонентами исследуемого ФС (см. рисунок 1.3).

Исследование параметра r_0 и времени вращательной диффузии τ_{rot} при разных режимах возбуждения было проведено также в растворах разной кис-

лотности, поскольку, как было показано ранее (см. рисунок 3.2 (а)) изменение кислотности раствора существенно влияло на время затухания изотропной части флуоресценции Радахлорина, предположительно из-за протонирования/депротонирования карбоксильных групп молекулы хлорина еб [17; 197]. Результаты анализа время-разрешенных сигналов анизотропии флуоресценции Радахлорина, полученные в зависимости от рН раствора при ОРЕ и ТРЕ приведены на рисунке 3.12 (а) и (с) для времени вращательной диффузии τ_{rot} и параметра начальной анизотропии r_0 , соответственно.

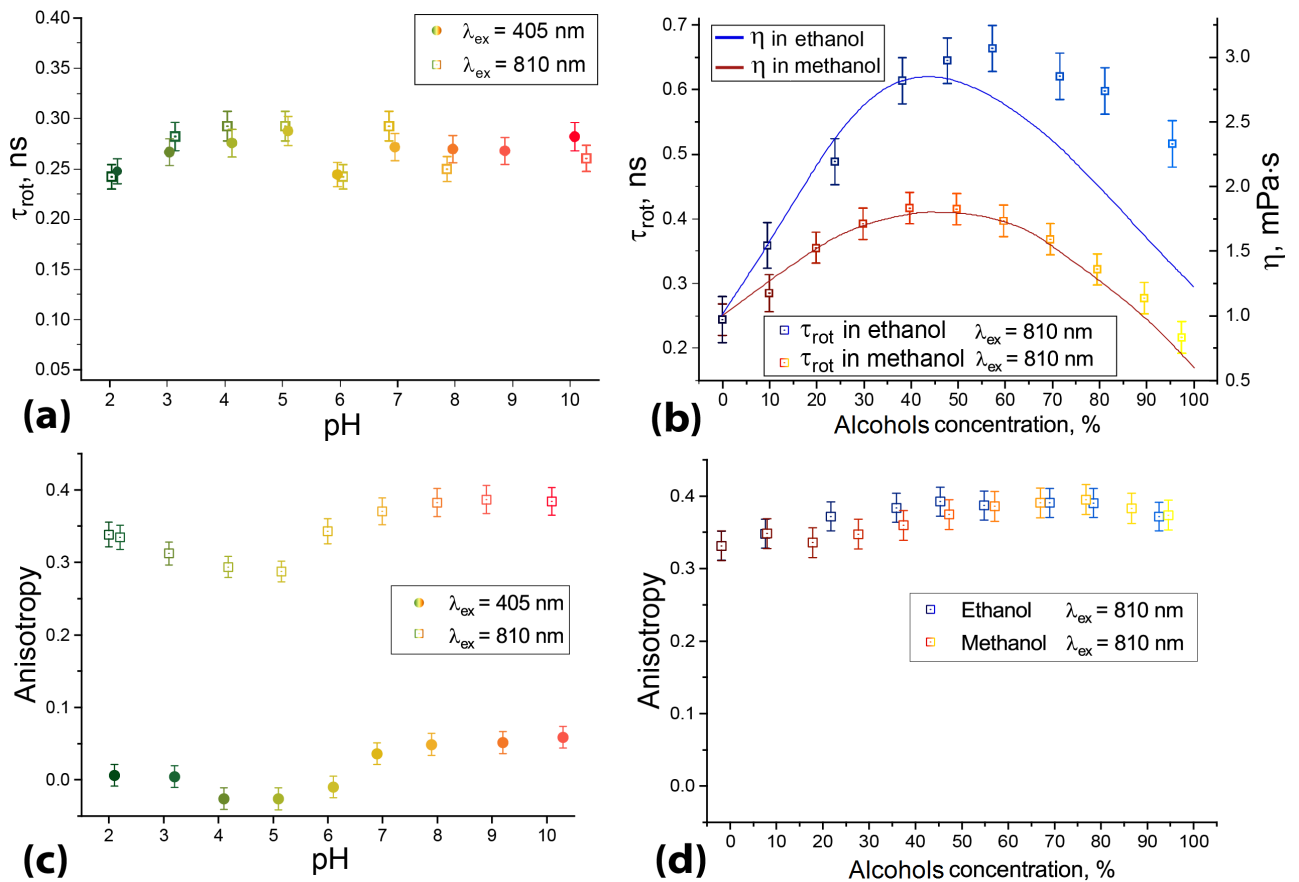


Рисунок 3.12 — Время вращательной диффузии Радахлорина в зависимости от рН раствора (а) и концентрации спирта (б). Вязкость раствора в зависимости от концентрации спирта показана на рисунке (б) сплошными линиями. Анизотропия флуоресценции Радахлорина в зависимости от рН раствора (с) и концентрации спирта (д).

Как видно из рисунка 3.12 (а) изменение рН раствора не приводит к существенным изменениям времени вращательной диффузии, поскольку τ_{rot} характеризует вязкость окружающей среды, которая не менялась с изменением кислотности исследуемого раствора. В то же время, как при ОРЕ, так и при ТРЕ наблюдалось некоторое уменьшение анизотропии флуоресценции в диапа-

зоне рН от 3 до 6 с выходом на плато в диапазоне значений рН 6-10 (рис. 3.12(с)). При этом значения параметра анизотропии r_0 , полученные при однофотонном (405 нм) и двухфотонном (810 нм) режимах возбуждения, существенно различаются, хотя и имеют общую тенденцию небольших изменений при варьировании рН.

Таким образом, мы показали, что значения параметра анизотропии при однофотонном и двухфотонном режимах возбуждения существенно отличаются, причем при двухфотонном возбуждении во всех исследуемых растворах наблюдались значительно более высокие значения r_0 . Поэтому однофотонное возбуждение на длине волны 405 нм менее предпочтительно для оценки времени вращательной диффузии молекул исследуемого ФС из-за относительно высокой погрешности, а измерения поляризованной флуоресценции в режиме двухфотонного возбуждения дают более точные данные.

Исследование параметров затухания анизотропной части флуоресценции Радахлорина $r(t)$ было проведено в режиме ТРЕ с возбуждением на длине волны 820 нм в водно-этанольных и водно-метанольных растворах с разной концентрацией спирта. Значения параметра начальной анизотропии r_0 в растворах метанола и этанола оказались близкими и продемонстрировали незначительное увеличение с ростом концентрации спирта, почти в пределах погрешности, см. рисунок 3.12 (d). Зависимости полученных значений времени вращательной диффузии τ_{rot} в водных растворах метанола и этанола, а также вязкости исследуемых растворов, от концентрации спирта приведены на рисунке 3.12 (b). Как упоминалось ранее τ_{rot} зависит от вязкости окружающей среды. При этом видно, что зависимость τ_{rot} от концентрации спиртов демонстрирует идеальную корреляцию с вязкостью раствора для метанола и хорошее соответствие для этанола при концентрациях примерно до 50%. Однако при более высоких концентрациях этанола τ_{rot} демонстрирует более высокие значения, чем те, которые ожидаются исходя из вязкости раствора.

В общем случае зависимость времени вращательной диффузии τ_{rot} от вязкости растворителя может быть описана с помощью соотношения Эйнштейна-Стокса [204]:

$$\tau_{rot} = fC \frac{\eta V}{kT}, \quad (3.11)$$

где k и T - постоянная Больцмана и температура, соответственно, V - Ван-дер-Ваальсов объем молекул растворенного вещества, η - макроскопическая вязкость растворителя, $f \geq 1$ - коэффициент, характеризующий форму молекул растворенного вещества, а C - коэффициент, обозначающий трение между растворенным веществом и растворителем. Таким образом, если форма молекулы ($V = const, f = const$) и коэффициент $C = const$ не изменяются в зависимости от условий микроокружения, то время вращательной диффузии становится показателем локальной вязкости [204]. Однако V , f и C могут варьироваться в зависимости от типа растворителя, что нарушает прямую пропорциональность между τ_{rot} и η . Например, для молекулы NADH в водно-метанольных растворах несоответствие между вязкостью и временем вращательной диффузии вызвано изменением конформации NADH при высоких концентрациях метанола [196]. В случае Радахлорина параметр формы f молекулы ФС, вероятно, остается постоянным из-за жесткой структуры молекул ФС и используемых типов растворителей. Однако, нарушение прямой пропорциональности времени вращательной диффузии τ_{rot} и вязкости η растворителя может быть связано с изменением C и V . Так, при высоких концентрациях этанола (см. рисунок 3.12 (b)) может происходить изменение Ван-дер-Ваальсова объема молекулы V и коэффициента трения C при различных условиях сольватации.

3.4 Анализ времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин во внутриклеточной среде в зависимости от условий микроокружения

Результаты исследования фотофизических свойств ФС Радахлорин в водных и водно-спиртовых растворах, описанные в предыдущей главе, были использованы для изучения его свойств во внутриклеточной среде, представляющих большой практический интерес. Полученные в разделе 3.1 зависимости относительного квантового выхода и времени затухания флуоресценции Радахлорина от кислотности и полярности растворов ставят под сомнение корректность оценок преимущественного накопления молекул Радахлорина в клетках и тканях на основе распределений интенсивности его флуоресценции, поскольку

внутриклеточная среда неоднородна, в частности по уровню pH, а опухолевые ткани характеризуются более низким уровнем pH, чем здоровые.

Исследования пространственных распределений параметров время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде были проведены с использованием установки FLIM-микроскопии, которая применялась для изучения параметров флуоресценции Радахлорина в растворах в разделе 3.1. Установка была оснащена конфокальным сканирующим модулем DCS-120 счета одиночных фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) (Becker&Hickl), который был установлен в оптический путь микроскопа Ti-2A (Nikon). Для достижения высокого пространственного разрешения флуоресцентных изображений внутриклеточной среды использовался объектив микроскопа 60x с числовой апертурой $NA = 1,49$ (Nikon). Возбуждение молекул ФС Радахлорин проводилось с помощью пикосекундного лазера BDS-SM-405-PS-101 с длительностью импульсов 60 пс и частотой следования импульсов 20 МГц, излучающего на длине волны 405 нм, вблизи максимума полосы поглощения ФС (см. рисунок 1.4). Достаточно низкая частота следования лазерных импульсов обеспечивала возможность регистрации полных кривых затухания сигнала флуоресценции, которые регистрировались в режиме счета одиночных фотонов с использованием гибридного GaAsP-фотоприемника НРМ-100-40 (Becker&Hickl) с временным откликом 120 пс (IRF). Сигнал флуоресценции Радахлорина спектрально выделялся полосовым интерференционным фильтром ВР645/75 (Chroma), полоса пропускания которого соответствовала максимуму спектра флуоресценции Радахлорина (см. рисунок 1.4), а для отсекающего возбуждающего лазерного излучения и автофлуоресценции внутриклеточной среды использовался длинноволновый фильтр LP425 (Chroma). Сигнал флуоресценции ФС накапливался в течении 30-60 с для достижения, по меньшей мере, 10^4 фотонов под кривой затухания флуоресценции. Для увеличения числа регистрируемых фотонов, увеличения скорости обработки и упрощения процедуры анализа данных производилась пиксельная бинаризация (биннинг - объединение соседних пикселей) по 5 соседним пикселям [205].

Анализ сигналов флуоресценции Радахлорина с временным разрешением в каждой группе пикселей флуоресцентного изображения выполнялся с помощью программного обеспечения SPCImage (Becker&Hickl), и включал в себя свертку одноэкспоненциальной функции затухания и IRF, преимущественно ха-

рактизирующейся временем отклика датчика. На основе результатов аппроксимации время-разрешенных сигналов, регистрируемых в каждой группе пикселей изображения, формировалось пространственное распределение времен затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточном пространстве для каждого поля зрения. Для визуализации полученных результатов вычисленное в ходе подгонки время затухания флуоресценции Радахлорина τ_{fl} в каждой точке изображения обозначалось цветом, где синему цвету соответствовали меньшие времена затухания, а красному - большие.

В ходе работы по исследованию свойств флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде были использованы разные типы клеточных линий для минимизации случайных зависимостей от типа клеток и для обобщения полученных зависимостей свойств флуоресценции Радахлорина от его микроокружения. Исследование флуоресценции ФС проводилось во внутриклеточной среде в живых клетках *in vitro*. Клетки стандартизованных линий HeLa, A549 и 3T3 (из коллекции клеточных линий Института цитологии РАН) культивировались в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Спустя 48 часов после посева клеток, в питательную среду добавлялся фотосенсибилизатор Радахлорин в концентрации 30 μ M, после чего, в течение 24 часов инкубации клеток в растворе ФС происходило его проникновение и накопление в клетках. Впоследствии для минимизации сигнала флуоресценции ФС вне клеток, раствор питательной среды с ФС заменялся на чистую питательную среду DMEM. Регистрация пространственных распределений время-разрешенных профилей затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде проводилась при физиологических условиях жизни клеток: температуре 37°C, 50% влажности и атмосфере с 5% содержанием CO₂, поддерживаемых инкубатором, который устанавливался внутрь FLIM-микроскопа.

В ходе исследования свойств флуоресценции Радахлорина сначала были получены пространственные распределения интенсивности и времени затухания флуоресценции ФС во внутриклеточной среде живых клеток трех разных линий, HeLa A549 и 3T3. Типичные пространственные распределения интенсивности и времен затухания флуоресценции Радахлорина в клетках разных линий, полученные при одинаковых условиях эксперимента, представле-

ны на рисунке 3.13 (a)-(c) и (d)-(f), соответственно. Как видно из рисунка 3.13 (d)-(f), где цветом обозначены времена затухания флуоресценции в каждой точке изображения, во внутриклеточном пространстве наблюдается значительная неоднородность значений времени затухания флуоресценции Радахлорина τ_{fl} . При этом, стоит отметить, что в каждой точке внутриклеточного пространства время-разрешенные сигналы флуоресценции ФС хорошо описываются одноэкспоненциальными функциями. Так, в ходе подгонки экспериментальных сигналов с использованием одноэкспоненциальной модели невязка составляла $\chi^2 < 1,25$, небольшое отклонение от одноэкспоненциальной зависимости можно объяснить как неидеальностью оптической системы микроскопа и не дельтаобразной функцией рассеяния точки, так и необходимостью объединения сигналов флуоресценции с нескольких соседних пикселей (бининг), в которых молекула ФС может находиться в разных условиях микроокружения. Из рисунка 3.13 (d)-(f) видно, что во внутриклеточной среде наиболее сильные пространственные неоднородности времени затухания флуоресценции Радахлорина наблюдались вблизи ядер клеток, где типичные времена затухания находились в диапазоне 3,2–3,3 нс (соответствует синему цвету), в то время как в других областях клеток τ_{fl} было значительно выше и достигало 6,0 нс (показаны красным цветом на рисунке 3.13 (d)-(f)). Кроме неоднородности распределения времени затухания τ_{fl} анализ флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде показал, что интенсивность флуоресценции в околядерных областях в несколько раз выше, чем в других областях, при этом области с высокой интенсивностью флуоресценции Радахлорина на рисунке 3.13 почти полностью совпадают с областями, где наблюдались низкие времена затухания флуоресценции τ_{fl} .

Основываясь на результатах измерения времен затухания и квантового выхода флуоресценции Радахлорина в растворах разной кислотности и полярности, приведенных в предыдущей главе, можно предположить, что варьирование внутри клетки интенсивности и времени затухания флуоресценции Радахлорина связано с различным микроокружением ФС во внутриклеточной среде. Стоит отметить, что типичное время затухания флуоресценции Радахлорина внутри клеток несколько больше ($\tau_{fl} \approx 3,5-6$ нс, со средним значением $\langle \tau_{fl} \rangle \approx 5$ нс), чем в водных растворах Радахлорина ($\tau_{fl} \approx 3-4,2$ нс, см. рисунок 3.2 (a)). Возможно, различие в наблюдаемых диапазонах времен затухания флуоресценции во внутриклеточной среде и в водных растворах может быть

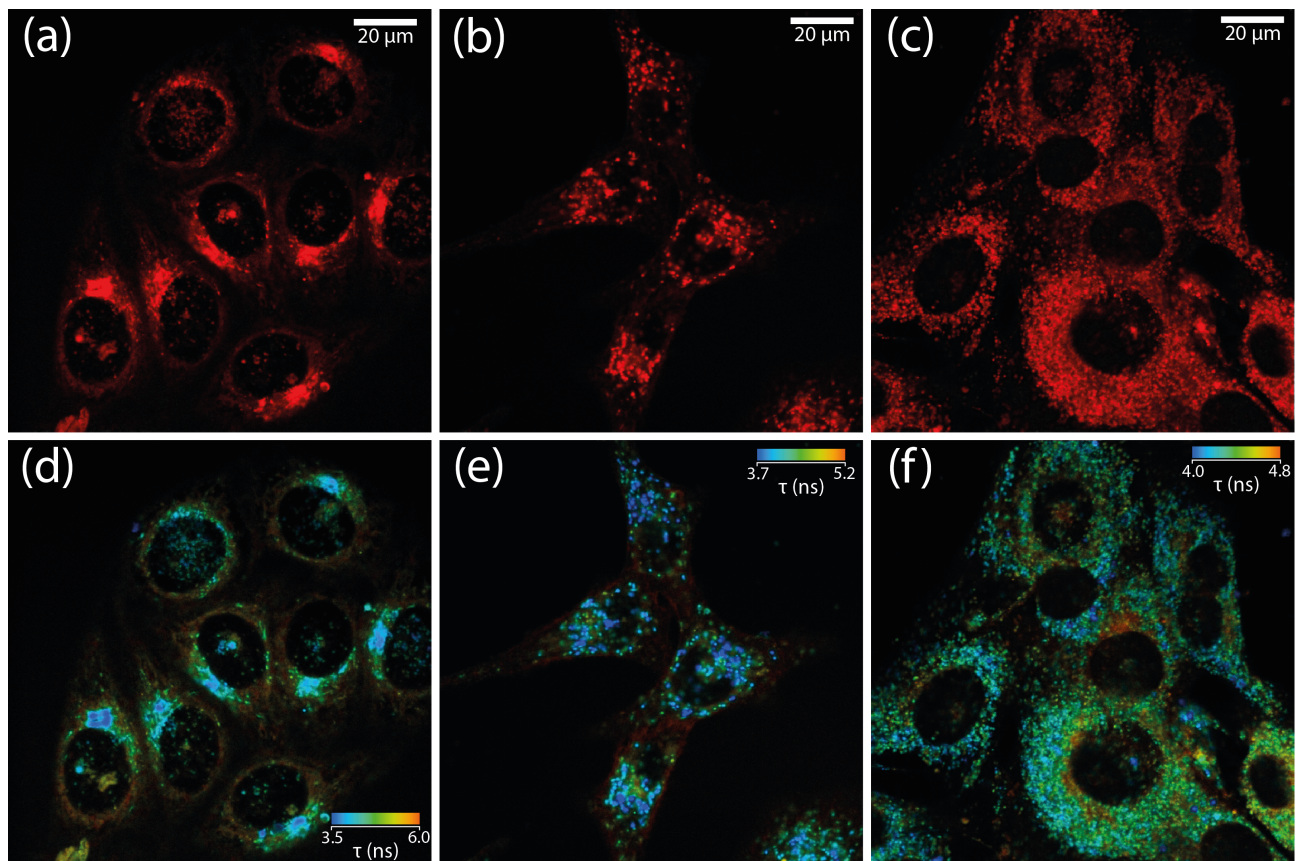


Рисунок 3.13 — Пространственные распределения интенсивности (а-с) и времени затухания (d-f) флуоресценции Радахлорина в трех типах живых клеток: HeLa (а, d), A549 (b, e) и 3Т3 (с, f).

объяснено различными параметрами микроокружения молекулы ФС, в частности полярностью. В научной литературе на основе косвенных измерений, проведенных флуоресцентными методами [206; 207] получены значения средней диэлектрической проницаемости разных областей внутриклеточной среды, которые варьируются в диапазонах $\langle \epsilon \rangle \approx 4-6$ в липидных структурах, 7-9 в эндосомах и 24-26 в цитозоле (жидкая фракция цитоплазмы) клеток. При проведении экспериментов, описанных в разделе 3.1, по исследованию зависимости свойств Радахлорина от полярности растворителей в водно-спиртовых растворах, диэлектрическая проницаемость растворителя менялась в диапазоне от 80 (чистая вода) с увеличением доли спиртов до $\epsilon = 33$ для метанола и $\epsilon = 24$ для этанола, при этом время затухания флуоресценции Радахлорина увеличивалось с уменьшением полярности растворителя и достигало плато уже при 60% фракции спиртов в растворе (см. рисунок 3.4 (b)). Исходя из литературных данных полярность во внутриклеточной среде в цитозоле ($\langle \epsilon \rangle \approx 25$) близка к значениям диэлектрической проницаемости этанола ($\epsilon = 24$) и метанола ($\epsilon = 33$), в

растворах которых время затухания флуоресценции Радахлорина τ_{fl} составило около 4,7 нс и 4,4 нс, соответственно, что близко к наблюдаемому среднему времени затухания во внутриклеточной среде ($\langle \tau_{fl} \rangle \approx 5$ нс). Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое увеличение времени затухания флуоресценции τ_{fl} Радахлорина во внутриклеточной среде по отношению к водным растворам главным образом вызвано низкой полярностью внутриклеточной среды.

Вместе с тем, варьирование времени затухания во внутриклеточном пространстве в диапазоне $\tau_{fl} \approx 3,5-6$ нс может быть также вызвано неоднородным уровнем кислотности. Так, ранее в разделе 3.1 на водных растворах ФС было показано, что изменение уровня pH в диапазоне 4-9 приводит к изменению τ_{fl} на 1 нс (см. рисунок 3.2 (a)), что позволяет предположить корреляцию неоднородности времени затухания флуоресценции с уровнем pH внутриклеточной среды. Для подтверждения этого, были проведены дополнительные эксперименты со стандартными маркерами внутриклеточных структур, в ходе которых было получено, что области с малыми временами затухания и большей интенсивностью флуоресценции Радахлорина совпадают с локализацией лизосом (см рисунок 3.14). Также полученные результаты по локализации молекул ФС во внутриклеточной среде хорошо согласуются с результатами работы [179], где было показано, что Радахлорин преимущественно накапливается в лизосомах клеток. При этом, хорошо известно, что лизосомы обладают наименьшим pH в районе 4,5, в то время как уровень кислотности в цитоплазме составляет порядка 7,2 [208]. Как можно видеть из рисунка 3.14, области окрашенные в зеленый цвет флуоресцентным маркером лизосом в первой колонке совпадают с яркими областями высокой интенсивности флуоресценции Радахлорина во второй колонке и с областями низких времен затухания флуоресценции ФС, обозначенные синим цветом, в третьей колонке. На рисунке 3.14 (d,h,l) синим цветом показаны примеры время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в области лизосом, характеризующихся pH около 4,5, а красным цветом - сигналы флуоресценции в области цитоплазмы в клетках каждой линии. Хорошо видно, что сигналы, полученные из областей внутриклеточного пространства с низким уровнем pH, затухают быстрее, чем из областей с более высоким pH, что полностью согласуется с результатами, полученными на водных растворах ФС разной кислотности в разделе 3.1.

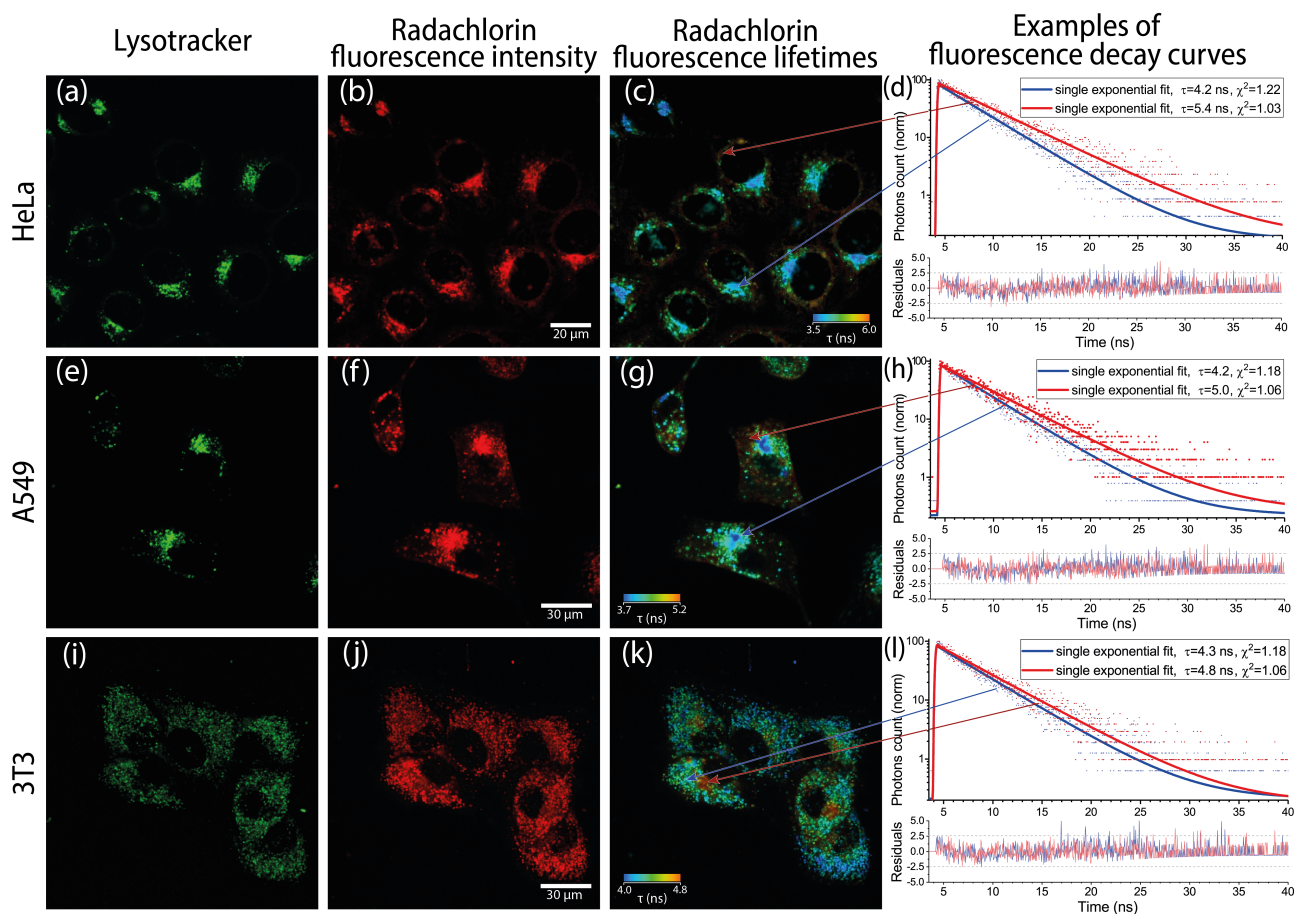


Рисунок 3.14 — Изображения колокализации интенсивности флуоресценции маркера лизосом LysoTracker (a,e,i), интенсивности флуоресценции Радахлорина (b,f,j) и времени затухания флуоресценции (c,g,k) в трех типах живых клеток: HeLa (a-d), A549 (e-h) и 3T3 (i-l). Примеры время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде с относительно длинным и коротким временем затухания флуоресценции (d,h,l).

Для подтверждения влияния pH микроокружения внутриклеточной среды на время затухания флуоресценции ФС был проведен эксперимент, в ходе которого искусственно был выровнен уровень pH внутри исследуемых клеток с помощью препарата бафиломицин A1 (Baf A1). Были проведены измерения пространственных распределений времен затухания флуоресценции Радахлорина в нормальных условиях и при выравнивании pH во внутриклеточной среде в разных клеточных линиях, результаты экспериментов представлены на рисунке 3.15. Как видно из рисунка 3.15 (верхний ряд) выравнивание pH во внутриклеточной среде приводит к более однородным распределениям времен затухания флуоресценции ФС по сравнению с нормальными условиями. При этом вымывание бафиломицина A1 и мониторинг времен затухания флуоресценции через

20 минут показывает восстановление разнообразия времен затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде, как показано на рисунке 3.16. Таким образом, проведенные эксперименты по определению областей с низким уровнем рН (лизосом) и по выравниванию рН во внутриклеточной среде доказывает ведущую роль уровня кислотности в варьировании времени затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде.

Кроме неоднородности времени затухания τ_{fl} анализ флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде показал, что интенсивность флуоресценции Радахлорина в областях внутриклеточного пространства (лизосомы) с низким уровнем рН около 4,5, в несколько раз выше, чем в других областях (см. рисунок 3.14, вторая колонка). Вместе с тем, области высокой интенсивности флуоресценции Радахлорина на рисунках 3.13 и 3.14 почти полностью совпадают с областями, где наблюдались низкие времена затухания флуоресценции τ_{fl} . Для подтверждения корреляции между интенсивностью и временем затухания τ_{fl} флуоресценции была построена диаграмма рассеяния, представленная на рисунке 3.17 (b), где каждая точка диаграммы соответствует пикселю поля зрения, представленного на рисунке 3.17 (a), с определенной интенсивностью и временем затухания флуоресценции. При этом на диаграмме рассеяния хорошо видно, что области с более высокой интенсивностью характеризуются малыми временами затухания флуоресценции, находящимися в областях с низким уровнем рН. С другой стороны ранее в ходе исследования водных растворов ФС было получено, что квантовый выход флуоресценции (FQY) Радахлорина уменьшается с уменьшением рН растворителя (см. рисунок 3.2 (b)). Таким образом, можно сделать вывод, что наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции в областях с низким временем затухания флуоресценции и уровнем рН, характеризующимся низким FQY, связано именно с преимущественным накоплением молекул ФС в областях с кислым уровнем рН (в лизосомах).

Как отмечалось ранее в разделе 1.3, анализ время-разрешенных сигналов возможен без подгонки экспериментальных данных заданной модельной функцией, а именно в ходе представления сигналов затухания флуоресценции в виде фазовых диаграмм (phasor plot), что упрощает обработку экспериментальных данных и не зависит от выбранной модельной функции аппроксимации данных. В результате такого анализа флуоресцентное изображение, в каждом пикселе которого прописан время-разрешенный сигнал флуоресценции, представляет-

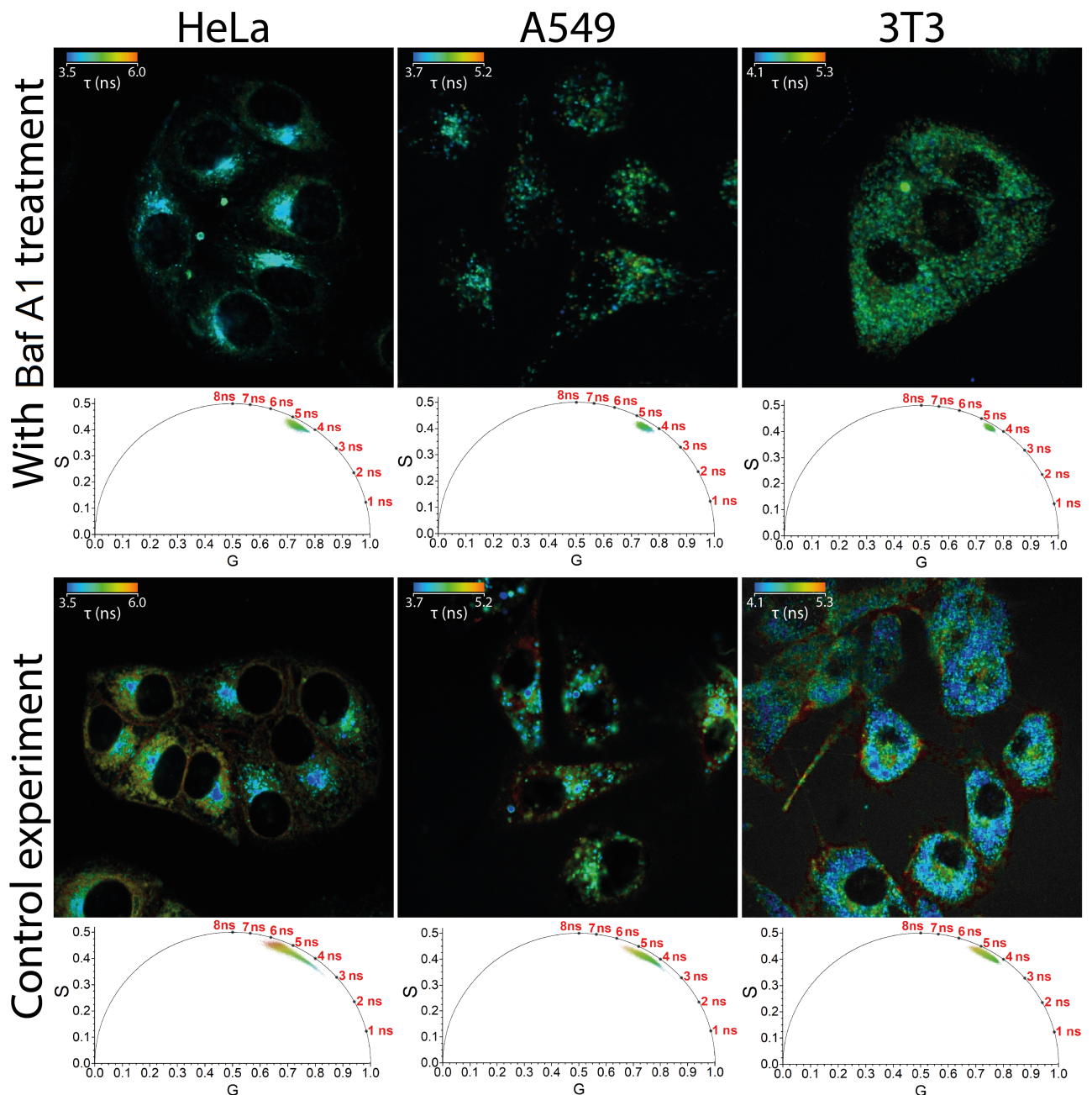


Рисунок 3.15 — Пространственные распределения времен затухания флуоресценции Радахлорина в трех типах клеток при выравнивании уровня рН бафиломицином А1 (верхний ряд) и при нормальных условиях (нижний ряд). Фазовые диаграммы (phasor plot), показанные под каждым распределением τ_{fl} , демонстрируют меньшее разнообразие значений времени затухания флуоресценции при выравнивании рН во внутриклеточной среде бафиломицином А1.

ся в виде диаграммы рассеяния, где каждая точка соответствует конкретному пикселю и располагается согласно G и S координатами косинусоидального (G) и синусоидального (S) Фурье-преобразования зарегистрированного сигнала в

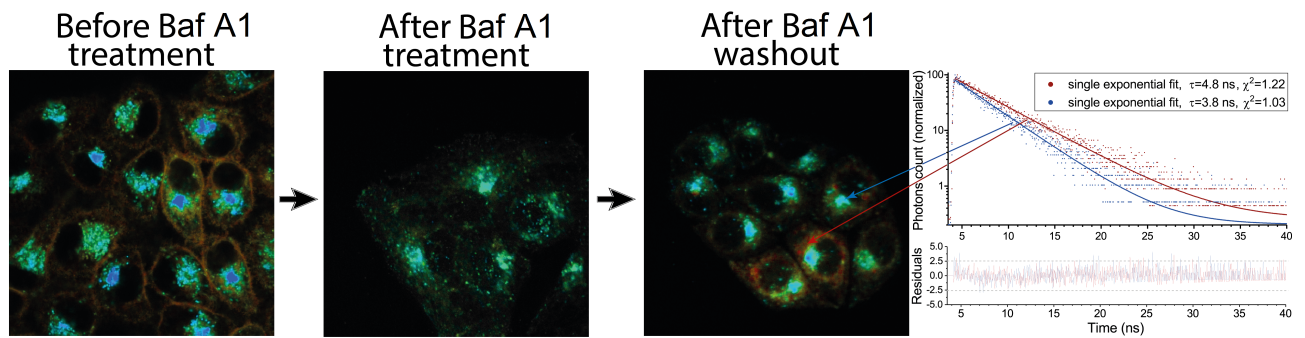


Рисунок 3.16 — Пространственные распределения времен затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде клеток линии HeLa, полученные до и после выравнивания внутриклеточного pH препаратом Baf A1, и после вымывания Baf A1 из внутриклеточной среды через 20 минут, что приводило к восстановлению нормального уровня pH. Примеры время-разрешенных сигналов флуоресценции ФС показаны справа, видно, что после вымывания Baf A1 происходит частичное восстановление разнообразия времен затухания флуоресценции и можно наблюдать области внутриклеточной среды со значительно отличающимися τ_{fl} .

соответствующем пикселе флуоресцентного изображения (см. формулы 1.3 в разделе 1.3). Применяемые методы анализов фазовых диаграмм были ранее апробированы в работе [117] в ходе изучения методом FLIM микроскопии флуоресценции Радахлорина в образцах гистологических срезов тканей до и после воздействия возбуждающего лазера. Полученные время-разрешенные сигналы флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде, помимо подгонки одноэкспоненциальными функциями, были также проанализированы с помощью представления их в виде фазовых диаграмм с использованием программного обеспечения SPCImage.

Примеры фазовых диаграмм для каждого пространственного распределения время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина во внутриклеточном пространстве представлены на рисунке 3.15. Стоит отметить, что при выравнивании кислотности внутриклеточной среды с помощью Baf A1 точки на графиках локализованы более близко друг к другу, что согласно свойствам фазовых диаграмм говорит о большей схожести динамик сигналов, чем для нормальных условий внутриклеточной среды (вторая строчка рисунка 3.15), также как и ранее это было показано с помощью аппроксимации данных одноэкспоненциальными функциями. Анализ фазовых диаграмм значительно убыстряет

обработку данных и позволяет проводить автоматизацию процедуры анализа результатов.

На основе полученных данных зависимости время-разрешенных сигналов флуоресценции ФС от кислотности микроокружения был разработан алгоритм автоматической сегментации областей внутриклеточной среды. Анализ данных, включая кластеризацию внутриклеточного пространства на основе фазовых диаграмм, был выполнен в программном пакете собственной разработки на платформе MatLab. Значительная разница во времени затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде (см. рисунок 3.13 и 3.14) свидетельствует о существенном разнообразии микроокружения (в частности, как было показано ранее, уровне кислотности), влияющем на параметры флуоресценции. Принимая во внимание наблюдаемую разницу во времени затухания флуоресценции Радахлорина в разных частях внутриклеточной среды была проведена сегментация областей и их классификация на две группы, соответствующие относительно коротким и длинным временам затухания флуоресценции. Чтобы упростить процедуру сегментации и получить надежные данные, был разработан алгоритм автоматической кластеризации фазовых диаграмм. В основе алгоритма лежит кластеризация время-разрешенных пространственных распределений сигналов флуоресценции Радахлорина во внутриклеточном пространстве путем сопоставления двумерных графиков рассеяния phasor-plot с двумя 2D-Гауссовыми распределениями. На рисунке 3.17 (а) показано типичное распределение времен затухания флуоресценции Радахлорина, полученное в ходе аппроксимации сигналов в каждом пикселе одноэкспоненциальной функцией, соответствующая ему фазовая диаграмма показана на рисунке 3.17(d), где также показаны пунктирными линиями результат фитирования phasor-plot двумя 2D-гауссовыми распределениями. При обратном переходе из координат phasor-plot в пространство координат изображения пиксели, попадающие в первый кластер (в одно 2D-гауссово распределение), окрашивались в голубой цвет и обладали относительно короткими временами затухания флуоресценции, а при попадании во второй кластер (во второе 2D-гауссово распределение), окрашивались в желтый цвет и относились к группе относительно длинных времен затухания флуоресценции. Результат работы программы кластеризации время-разрешенного флуоресцентного изображения внутриклеточной среды на две области (голубая и желтая) с относительно короткими и длинными времена-

ми затухания флуоресценции представлен на рисунке 3.17 (с). Кроме того, на нескольких десятках флуоресцентных изображений с временным разрешением было показано, что кластер, окрашенный голубым цветом и характеризующийся короткими временами затухания флуоресценции, совпадает с локализацией кислых областей внутриклеточной среды (лизосом), что позволяет использовать данный алгоритм для анализа свойств флуоресценции Радахлорина в зависимости от уровня рН его микроокружения в клетках.

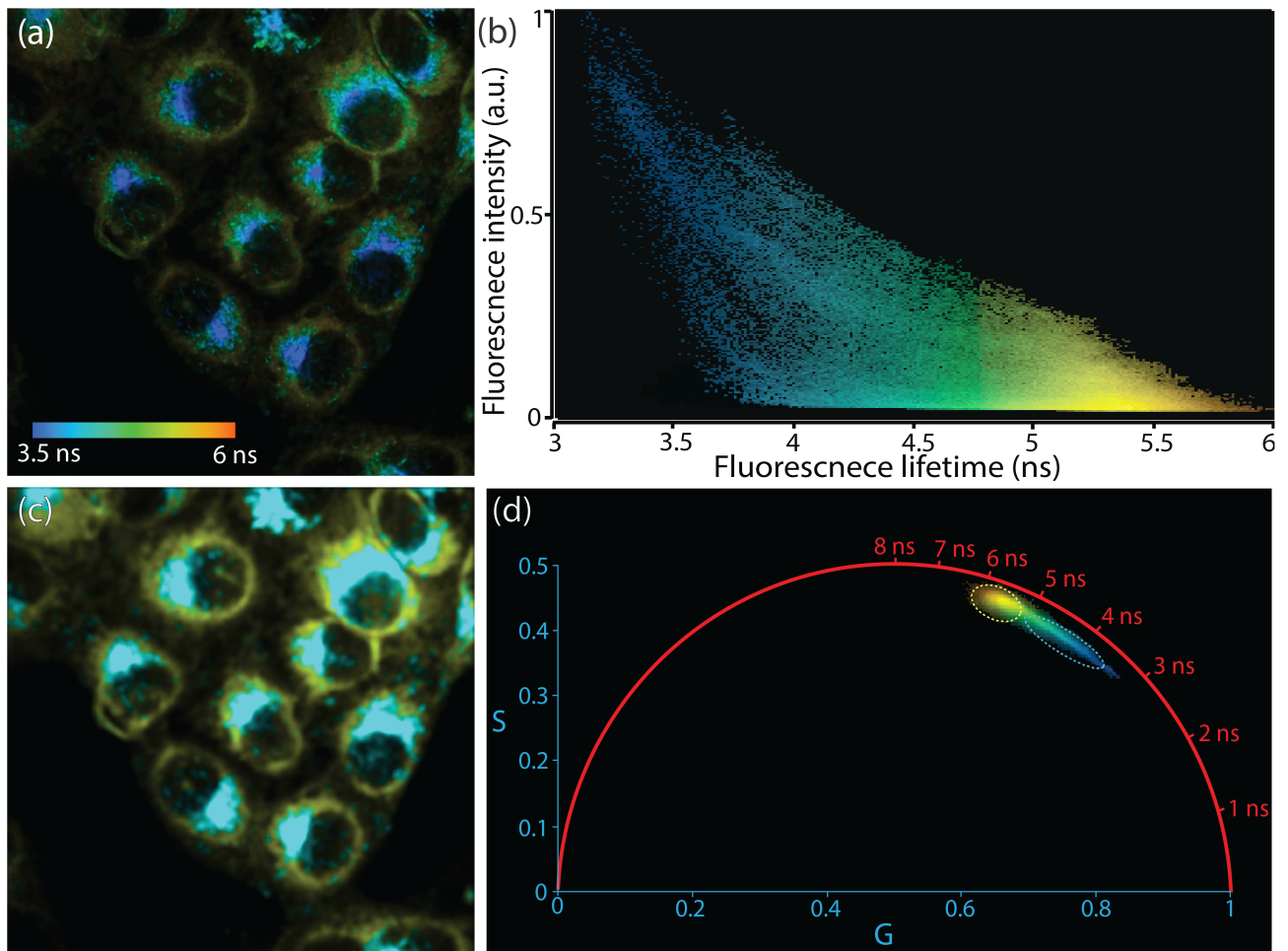


Рисунок 3.17 — (а) Пример пространственного распределения времен затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточной среде, (b) соответствующая ему диаграмма рассеяния, демонстрирующая корреляцию между интенсивностью и временем затухания флуоресценции Радахлорина, (с) результат кластеризации внутриклеточного пространства на два кластера с короткими и длинными временами затухания флуоресценции, (d) phasor-plot и результат его подгонки двумя двумерным гауссовыми функциями, обозначенный пунктирными эллипсами голубого и желтого цветов.

Представленный выше алгоритм был использован для анализа нескольких десятков флуоресцентных время-разрешенных изображений и были получены данные о средних интенсивностях и временах затухания флуоресценции Радахлорина в областях, соответствующих первому и второму кластеру, вычисленные средние значения представлены в таблице 4. Анализ флуоресценции Радахлорина в клетках разных линий и автоматическая кластеризация областей на фазовых диаграммах позволила получить средние значения времен затухания флуоресценции Радахлорина τ_{fl} в областях разной кислотности для каждой клеточной линии. Как видно из таблицы 4, средние τ_{fl} различаются как между типами раковых клеток (HeLa и A549), так и между раковыми и не раковыми клетками. Таким образом, разработанная методика может быть в дальнейшем расширена и применена для определения типа клеток или для определения их состояния по анализу флуоресценции ФС Радахлорин.

Таблица 4 — Среднее время затухания флуоресценции Радахлорина в двух автоматически выделяемых кластерах и соотношение интенсивностей флуоресценции в этих кластерах во внутриклеточной среде клеток разных линий. Данные были получены путем анализа и усреднения данных, полученных в нескольких десятках полей зрения.

	HeLa	A549	3T3
τ_{fl} (нс) в I-ом кластере	4.3	4.3	4.3
τ_{fl} (нс) в II-ом кластере	5.2	4.9	4.8
I_{I-st}/I_{II-nd} (y.e.)	2.7	2.3	2.0

Таким образом, в данной главе было проведено комплексное исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин, а именно времени затухания и относительного квантового выхода его флуоресценции, спектров флуоресценции и поглощения, времени вращательной диффузии и анизотропии в начальный момент времени, в водных и органических растворах разной кислотности, вязкости и полярности. Были проведены исследования фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого с помощью Радахлорина, в разных условия микроокружения. Экспериментально были получены зависимости времени вращательной диффузии молекул Радахлорина от вязкости раствора и анизотропии флуоресценции Радахлорина в начальный момент времени от длины волны возбуждения, представлено теоретическое обоснование полученных результатов.

Важным полученным результатом является зависимость времени затухания и относительного квантового выхода флуоресценции Радахлорина от кислотности микроокружения. При этом, была продемонстрирована зависимость времени затухания флуоресценции от уровня рН не только в растворах, но и во внутриклеточной среде, что наиболее приближено к практическим условиям. Наблюдалась сильная корреляция между временами затухания флуоресценции Радахлорина и областями разной кислотности, а также показано преимущественное влияние рН на варьирование времени затухания флуоресценции ФС во внутриклеточной среде. Кроме того, было показано, что фактическое количество Радахлорина в области внутриклеточного пространства с низким рН, оцениваемое исключительно по интенсивности его флуоресценции, может быть недооценено, в частности, из-за сильной зависимости квантового выхода флуоресценции от кислотности микроокружения. При этом, определение областей разной кислотности и, соответственно, определение квантового выхода флуоресценции возможно по анализу изменения времени затухания флуоресценции Радахлорина, а определение локализации областей с низким уровнем рН во внутриклеточном пространстве возможно с помощью представленного алгоритма кластеризации на основе анализа phasor-plots.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для точной оценки накопления Радахлорина в областях с разной кислотностью и полярностью, а также для определения параметров микроокружения молекул ФС по анализу время-разрешенных сигналов флуоресценции. Разработанный метод автоматической сегментации участков с разными рН может быть использован для статистических исследований внутриклеточных параметров клеток индивидуальных пациентов. Полученные результаты могут позволить расширить возможность использования данного фотосенсибилизатора в качестве не только терапевтического агента, но и диагностического инструмента, позволяющего получить дополнительную информацию о характеристиках внутриклеточной среды в результате анализа время-разрешенных характеристик флуоресценции. Кроме того, установленная в рамках данного исследования существенная зависимость квантового выхода флуоресценции ФС и квантового выхода генерации синглетного кислорода от кислотности и полярности среды показывает, что дозиметрия генерации синглетного кислорода по интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора не всегда является корректной.

Глава 4. Разработка голографического метода автоматического определения состояния клеток при фотодинамическом воздействии

Исследования фотофизических свойств фотосенсибилизатора, в частности Радахлорина, в разных модельных условиях позволяет лучше понять процессы, протекающие в ходе фотодинамической терапии, и впоследствии учитывать полученные результаты для усовершенствования методики. Кроме спектроскопических методов исследования флуоресценции ФС, его способности генерировать активные формы кислорода в разных условиях, важно изучать непосредственно реакцию и отклик клеточных структур на фотодинамическое воздействие с конкретным ФС. В настоящее время существует множество методов, используемых в цитологии для изучения реакции клеток на внешние воздействия, например конфокальная флуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия. Несмотря на широкое распространение флуоресцентных методов визуализации они обладают рядом недостатков, например в случае проточной цитометрии отсутствует возможность непрерывного мониторинга отдельной живой клетки. Такой широко используемый метод, как флуоресцентная микроскопия, требует введения в клетки посторонних флуорофоров, которые могут искажать суть исследуемых процессов. Таким образом, существует необходимость разработки новых и совершенствования имеющихся методов изучения клеточного отклика на внешнее воздействие.

В последние годы все больше внимания уделяется разработке и совершенствованию неинвазивных методов визуализации и анализа биологических объектов. Одной из таких групп подходов являются оптические методы фазовой визуализации, основанные на регистрации изменений фазы волнового фронта, проходящего через исследуемые структуры, которые были подробно рассмотрены в разделе 1.4. Методы фазовой визуализации (QPI) позволяют получать высококонтрастные изображения клеток без введения флуорофоров и проводить количественные оценки их оптических и морфологических параметров. К таким методам относятся внеосевая и осевая цифровая голографическая микроскопия и голографическая томография, которые уже хорошо себя зарекомендовали при исследовании различных процессов на клеточном уровне [134]. Методы цифровой голографической микроскопии позволяют исследовать изменения

фазового запаздывания регистрирующего излучения, которые предоставляют количественную информацию о пространственных распределениях оптических свойств клеток, последующий анализ которых позволяет определить ряд важных морфологических и оптических параметров. Важно отметить, что методы цифровой голографической микроскопии позволяют осуществлять мониторинг живых клеток в динамике в течение длительного времени из-за возможности использования малой плотности мощности регистрирующего излучения. В частности, несколько исследовательских групп занимались мониторингом *in vitro* отдельных живых клеток и их реакцией на внешние раздражители, включая, например, химиотерапию В-клеточной лимфомы [156], электропорацию клеток [157], арест клеточного цикла [209], воздействие цитопатического агента [158].

Широкий интерес к применению неинвазивных оптических методов исследования клеточных структур для биомедицинских целей требует развития методов обработки регистрируемых данных и сопоставления голографических данных с результатами стандартно применяемых в цитологии и клинической практике методов исследования. В данной главе представлен алгоритм автоматической сегментации клеточных структур, позволяющий проводить регистрацию и анализ большого количества данных для получения статистически значимых результатов. Предложен метод оценки эффективности фотодинамического воздействия с Радахлорином на основе динамики среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками. Также продемонстрирована возможность использования алгоритмов классификации для автоматического определения типа клеточной гибели, а именно некроза и апоптоза, на основе анализа динамики изменения сухой массы клеток и среднего фазового запаздывания, внесенного клетками в волновой фронт, и ряде других оптических клеточных параметров. Таким образом, в данной главе представлен набор инструментов для полной автоматизации голографического мониторинга и определения с помощью алгоритмов машинной классификации реакции клеток на фотодинамическое воздействие с фотосенсибилизатором Радахлорин.

4.1 Алгоритм автоматической сегментации фазовых изображений клеточных структур, полученных с помощью внеосевой цифровой голографической микроскопии

Как отмечалось ранее в разделе 1.4, существует множество методов получения распределения фазового запаздывания волнового фронта, прошедшего через исследуемый объект. Каждый из которых обладает своими преимуществами и недостатками, такими как наличие когерентного шума, сложность вычислений, требования к виброизоляции и неточности определения фазового сдвига волнового фронта [132]. Одним из прямых методов определения фазового запаздывания из регистрируемой интерференционной картины является метод цифровой голографической микроскопии, который обладает такими недостатками как требование к виброизоляции и наличие когерентного шума, но при этом является референтным методом определения фазового запаздывания, индуцированного объектом.

В настоящей работе для регистрации внеосевых цифровых голограмм исследуемых образцов и восстановления их пространственных распределений фазового запаздывания использовалась экспериментальная установка, основанная на интерферометре Маха-Цендера. В качестве источника излучения во внеосевом голографическом микроскопе применялся He-Ne лазер ($\lambda = 633$ нм), в предметном плече микроскопа была установлена микроскопическая система с числовой апертурой 0.45, обеспечивающая пространственное разрешение около 0.8 $\mu\text{м}$. Для регистрации внеосевых цифровых голограмм использовалась камера MD-USB121GM-T (MDvision Technology, Китай) с глобальным затвором, позволяющая избежать искажений регистрируемой картины интерференции, размер пикселя матрицы составлял 3.75 $\mu\text{м}$.

Используемая схема восстановления пространственного распределения фазового запаздывания, индуцированного клеточными структурами в проходящий волновой фронт, подробно описана в работе [134]. Вначале на матрице цифровой камеры регистрировались голограммы области образца без и с клеточными структурами, а полученные интерференционные картины использовались для восстановления пространственных распределений фазового запаздывания, индуцированного соответствующими областями образца, с помощью численно-

го Фурье-анализа. Применяемый в работе метод восстановления цифровых голограмм широко используется [134] и детально описан в научной литературе [210]. Для устранения фазового сдвига, внесенного элементами установки, чашкой Петри и средой, в которой находится образец, из восстановленного фазового запаздывания, индуцированного клетками, вычиталось фоновое фазовое изображение без клеточных структур. Итоговое фазовое распределение представляет собой двумерный массив значений фазы в диапазоне $[0; 2\pi]$, которые отличаются от абсолютных значений фазового запаздывания из-за ограничения на диапазон восстанавливаемых значений алгоритмом, основанным на Фурье-преобразовании. Абсолютные значения фазового сдвига, индуцированного в каждой точке образца, определялись с помощью процедуры развертки фазовой картины [211]. Нормировка фазового изображения и выделение отдельной клетки позволяет получить информацию о фазовом сдвиге, внесенном конкретной клеткой, а на основе полученных фазовых распределений можно определить важные параметры клеточных структур, такие как объем, сухая масса, средняя толщина, и другие оптические и морфологические параметры [147], перечисленные в разделе 1.4.

Как отмечалось ранее в разделе 1.4, анализ оптических параметров клеток позволяет сделать выводы о результативности внешнего воздействия или увеличить точность диагностики ряда их состояний. Однако, для вычисления оптических параметров изучаемых объектов и их последующего анализа на их восстановленных распределениях фазового запаздывания необходимо выделить области, соответствующие границам клеточных структур – сегментировать клетки. При этом, описанные выше стандартно применяемые численные алгоритмы восстановления фазовых изображений возможно проводить в полностью автоматизированном режиме, несмотря на это на настоящий момент в цитологических исследованиях методом голографической микроскопии, количество анализируемых клеток в образце обычно не превышает 30-50, что связано с трудностями автоматического определения границ клеток на фазовых изображениях при наличии когерентного шума. Стоит отметить, что существует много коммерческих программ для сегментации клеток во флуоресцентной или оптической микроскопии, например ImageJ, которые не применимы при наличии когерентного шума. Существующие же алгоритмы сегментации клеток на их фазовых изображениях основаны или на морфологическом анализе изображе-

ния, а именно на реконструкции фазового изображения клеток овалом, размер которого задается исходя из средних размеров клеток конкретной клеточной линии [212], что занимает большое количество времени и компьютерной памяти, или на обработке фазовых изображений нейронными сетями [166], требующими большой базы для обучения.

В данном разделе представлен разработанный и используемый далее в работе алгоритм сегментации клеток, в основе которого лежат простые операции, сокращающие время работы программы и автоматического нахождения параметров сегментации, что позволяет увеличить количество анализируемых клеток в образце, а также исследовать клеточные линии, различающиеся по размерам. Применяемый алгоритм автоматической сегментации клеток на их восстановленных развернутых фазовых изображениях, схема которого представлена на рисунке 4.1, состоит из трех основных шагов.

(I) На первом этапе работы алгоритма устраняется неоднородность и наклон фона фазового изображения, а также проводится его нормировка на область без клеток. Вначале, для определения областей фона фазового изображения проводится анализ гистограммы распределения фазового запаздывания, индуцированного в каждой точке образца. Гистограмма распределения фазового запаздывания, индуцированного в каждом пикселе изображения, до устранения наклона фона и его нормировки представлена на рисунке 4.1 (b) для исходного фазового изображения, приведенного на рисунке 4.1 (a). Фазовое запаздывание фона восстановленного исходного фазового изображения варьируется в широком диапазоне (рис. 4.1 (a)) из-за влияния случайных слабо взаимосвязанных источников шума: вибраций, неоднородностей предметного стекла или чашки Петри, в которые помещены клеточные структуры, распределения по образцу фиксирующего вещества или питательной среды, когерентного шума и темного тока на матрице камеры. В предположении нормального распределения значений фазового запаздывания, индуцированного областями без клеток, фон определялся как совокупность пикселей, в которых изменение фазы прошедшего волнового фронта меньше среднеквадратичного отклонения (рис. 4.1 (b)). Аппроксимация выделенных пикселей плоскостью и учет ее при корректировке фазового изображения позволяет компенсировать наклон, а среднее значение полученного распределения используется как нормировочный коэффициент и позволяет нормировать фазовое изображение. Такой подход позволяет в

несколько итераций хорошо компенсировать наклон, нормировать изображение и определить диапазон значений фазового запаздывания фона (рис. 4.1, (а,с))

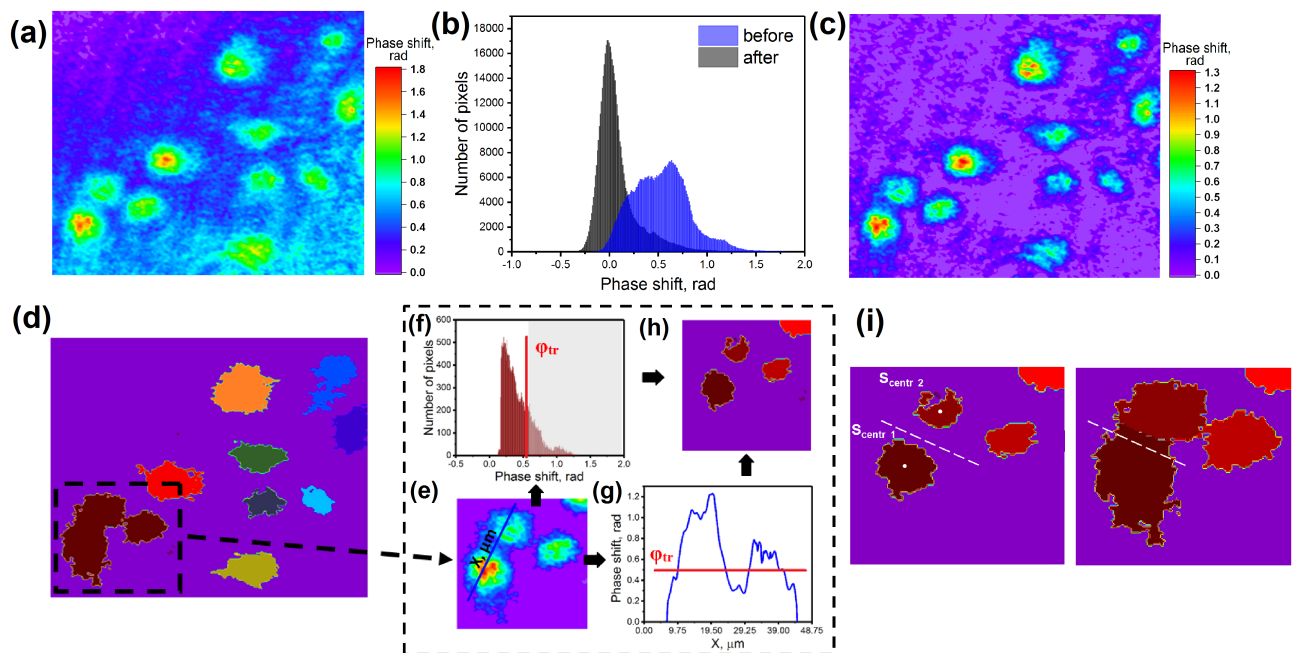


Рисунок 4.1 — Пример действия алгоритма сегментации. (а) — исходное пространственное распределение фазового запаздывания, индуцированного при прохождении через образец, (b) — гистограммы распределения фазового запаздывания до и после устранения наклона фона, (с) — фазовое изображение после устранения наклона фона, (d) — замкнутые области, в которых фазовое запаздывание находится вне диапазона значений фона, (е) — фазовое изображение смежных клеток при наложении маски, отсекающей области фона, f — гистограмма фазового запаздывания изображения (е), (g) — поперечное сечение вдоль синей линии, изображенной на рисунке (е), (h) — замкнутые области, в которых фазовое запаздывание выше ϕ_{tr} , (i) — результат расширения центров клеток при использовании относительного критерия ξ (результатирующие маски обозначены цветом). Белой штриховой линией обозначена граница при отсутствии деления на корень из площади центра S.

(II) На втором этапе работы алгоритма проводится поиск центров клеток. Вне диапазона значений фона, определенного на предыдущем этапе, выделяются замкнутые области, в которые попадают как отдельные клетки, так и их группы (рис. 4.1 (d)). Для точного разграничения смежных клеток внутри каждой такой замкнутой области производится построение статистического распределения фазового запаздывания (рис. 4.1 (е)), после чего определяется

пороговое значение φ_{tr} , отсекающее $1/3$ части пикселей с наибольшим фазовым запаздыванием в гистограмме (рис. 4.1 (f)). После этого центры клеток определяются как замкнутые области с фазовым запаздыванием $\varphi > \varphi_{tr}$ (рис. 4.1 (g)). Для найденных замкнутых областей центров клеток (рис. 4.1 (h)) рассчитываются их геометрические центры и площади S .

(III) Для уточнения границ клеток на фазовых изображениях далее проводится расширение найденных центров клеток (рис. 4.1 (i) слева) за счет присоединения пикселей, которые не входят в диапазон фона, определенного на первом этапе. Для точного определения границ смежных клеток был введен относительный коэффициент ξ , позволяющий однозначно присвоить каждую точку изображения к определенному на предыдущем этапе центру клетки:

$$\xi = \frac{r_c}{\sqrt{S}}$$

Пиксель присоединяется к тому центру, для которого расстояние до геометрического центра клетки r_c , разделенное на квадратный корень из площади этого центра S , наименьшее.

Выбранный критерий ξ практически не влияет на результат сегментации двух смежных клеток с близкими морфологическими параметрами, но позволяет повысить качество сегментации при анализе клеток в разных состояниях, что особенно актуально при исследовании клеток в процессе гибели, сопровождающемся изменением их морфологических параметров. Как видно из рис. 4.1 (i), при использовании абсолютного критерия, основанного на минимизации расстояния до центра клетки (при отсутствии деления на корень из площади центра S), разграничение клеток (отмеченное белой штриховой линией) происходит в области внутри клетки большего размера, что приводит к ложному результату. Окончательно сформированные маски смежных клеток, полученные при использовании относительного критерия ξ , показаны цветом на рис. 4.1 (i) справа. Результат работы алгоритма при анализе смежных клеточных структур представлен на рисунке 4.2.

Стоит отметить, что предложенный алгоритм адаптивно находит как диапазон фона, так и параметры, необходимые для нахождения границ между клетками, что является существенным преимуществом для автоматизации исследования клеток разных линий с различающимися морфологическими параметрами.

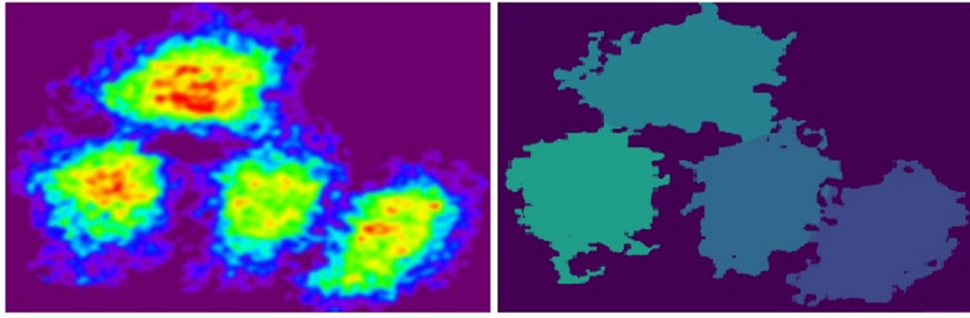


Рисунок 4.2 — Фазовое изображение клеток и результат их сегментации разработанным алгоритмом

ми. Сведение сегментации клеток к простым действиям позволило существенно сократить время обработки регистрируемых изображений. После определения границ клеток на их фазовых изображениях с помощью сформированных сегментов фазового изображения, соответствующих клеткам, рассчитываются оптические и морфологические параметры клеток, такие как площадь проекции, сухая масса, среднее по площади фазовое запаздывание, фазовый объем, площадь поверхности и индекс сферичности фазового профиля, формулы для определения которых представлены в разделе 1.4 и в научной литературе [147].

Выше в разделе 1.4 отмечалось, что регистрируемые с помощью цифровой голографической микроскопии двумерные распределения фазового запаздывания зависят как от пространственного распределения толщины объекта, так и от показателя преломления. При этом в ряде публикаций для получения данных о морфологических параметрах клеток из их фазовых изображений неопределенность показателя преломления/толщины устранялась в предположении постоянного показателя внутриклеточной среды. Таким образом, такое приближение позволяет напрямую рассчитать из пространственного распределения фазового запаздывания, индуцированного в каждой точке образца, карту его высоты и оценить ряд морфологических параметров: среднюю по площади клетки высоту h_{av} , объем V и площадь поверхности мембраны S_{surf} клетки, выражения для расчета которых представлены в разделе 1.4. Вместе с тем, изменение показателя преломления внутри отдельных клеток одного типа или между клетками разных клеточных линий могут привести к случайным и систематическим ошибкам в оценке клеточной морфологии. Поэтому была проведена оценка погрешности определения морфологических параметров клеток из их фазовых изображений, полученных с помощью голографической микроско-

пии в предположении постоянного показателя преломления внутриклеточной среды.

Оценка точности определения морфологических параметров, полученных из голографических данных, проводилась при сопоставлении с референтным методом конфокальной флуоресцентной микроскопии, широко используемой в цитологических исследованиях. Контрольные эксперименты проводились на клетках, окрашенных акридином оранжевым, и исследуемых в одних и тех же полях зрения на голографическом и флуоресцентном микроскопах. Регистрация флуоресцентных изображений проводилась на конфокальном флуоресцентном микроскопе Leica TCS SP5 в диапазоне 500-560 нм при возбуждении флуорофора акридина оранжевого на длине волны 488 нм. Пример флуоресцентного изображения фиксированных клеток линии HeLa показан на рисунке 4.3 (с). Конфокальный флуоресцентный микроскоп позволял получить серию поперечных сечений XY (шаг Z-сканирования $\approx 0,33$ мкм) при сканировании по толщине объекта, что далее в ходе её анализа позволило восстановить 3D-изображение клеток (см. рис. 4.3 d). Реконструкция 3D-профиля клеток была использована для определения морфологических параметров: средней по площади высоты клетки h_{av} , объема V и площади поверхности S_{surf} для нескольких десятков отдельных клеток. Полученные с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии параметры клеточных структур использовались в качестве референтных данных для сравнения с характеристиками, полученными в результате анализа фазовых изображений тех же клеток голографическим методом.

Оценка морфологических параметров клеток из их фазовых изображений (пример фазового изображения представлен на рис. 4.3 (а)) проводилась в предположении постоянного внутриклеточного показателя преломления $n_{cell} = \text{const}$, что позволило получить пространственное распределение высоты клеточных структур как $h(x,y) = \frac{\varphi(x,y) \cdot \lambda}{2\pi} (n_{cell}^{av} - n_{medium})$, где φ - фазовый сдвиг, индуцированный клетками, λ - длина волны излучения, прошедшего через образец, а n_{medium} - показатель преломления среды, в которой находились клетки. Пример полученного пространственного распределения высоты клеток представлен на рисунке 4.3 (b). Относительные ошибки вычисления средней высоты δh_{av} , объема δV и площади поверхности мембраны δS_{surf} из голографических данных относительно параметров, полученных при использовании конфокальной флуоресцентной микроскопии, были оценены для нескольких десятков отдельных

клеток в образце. Гистограммы относительных погрешностей оценки параметров показаны на рисунке 4.3 (e)–(g). Стоит отметить, что полученные данные указывают на то, что относительные случайные погрешности морфологических параметров могут быть оценены как: $\delta V = 13,2\%$, $\delta h_{av} = 12,9\%$ и $\delta S_{surf} = 15,6\%$. Вместе с тем, из-за наличия когерентного шума и внутриклеточных структур с высоким показателем преломления на пространственном распределении высоты, полученной на основе фазовых изображений, могут наблюдаться волнистые поверхности, что приводит к систематическому завышению площади поверхности мембраны примерно на 7%.

Несмотря на случайные ошибки, возникающие при оценке морфологии на основе голографических данных из-за когерентного шума, несовершенной сегментации и вариаций внутриклеточного показателя преломления, можно считать, что точность определения клеточных параметров является достаточной для анализа динамики отдельных клеток в ходе внешнего воздействия и для дифференциации типов и состояний клеток. Таким образом, точность оценки морфологических параметров клеточных структур, полученная с помощью голографической микроскопии, указывает на возможность использования этого метода для оценки морфологически зависимых процессов, таких как пути гибели клеток при некрозе или апоптозе.

Разработанный и описанный выше алгоритм сегментации клеток на их фазовых изображениях и методы определения морфологических параметров были использованы в настоящей работе для получения большой базы данных оптических и морфологических параметров клеток при разработке метода автоматической классификации реакции клеток на фотодинамическое воздействие с фотосенсибилизатором Радахлорин на основе голографических данных.

4.2 Голографическая микроскопия и томография как метод мониторинга динамики изменения параметров клеточных структур в результате фотодинамического воздействия

Описанная в разделе 4.1 установка цифрового голографического микроскопа, а также разработанный и апробированный алгоритм сегментации клеток

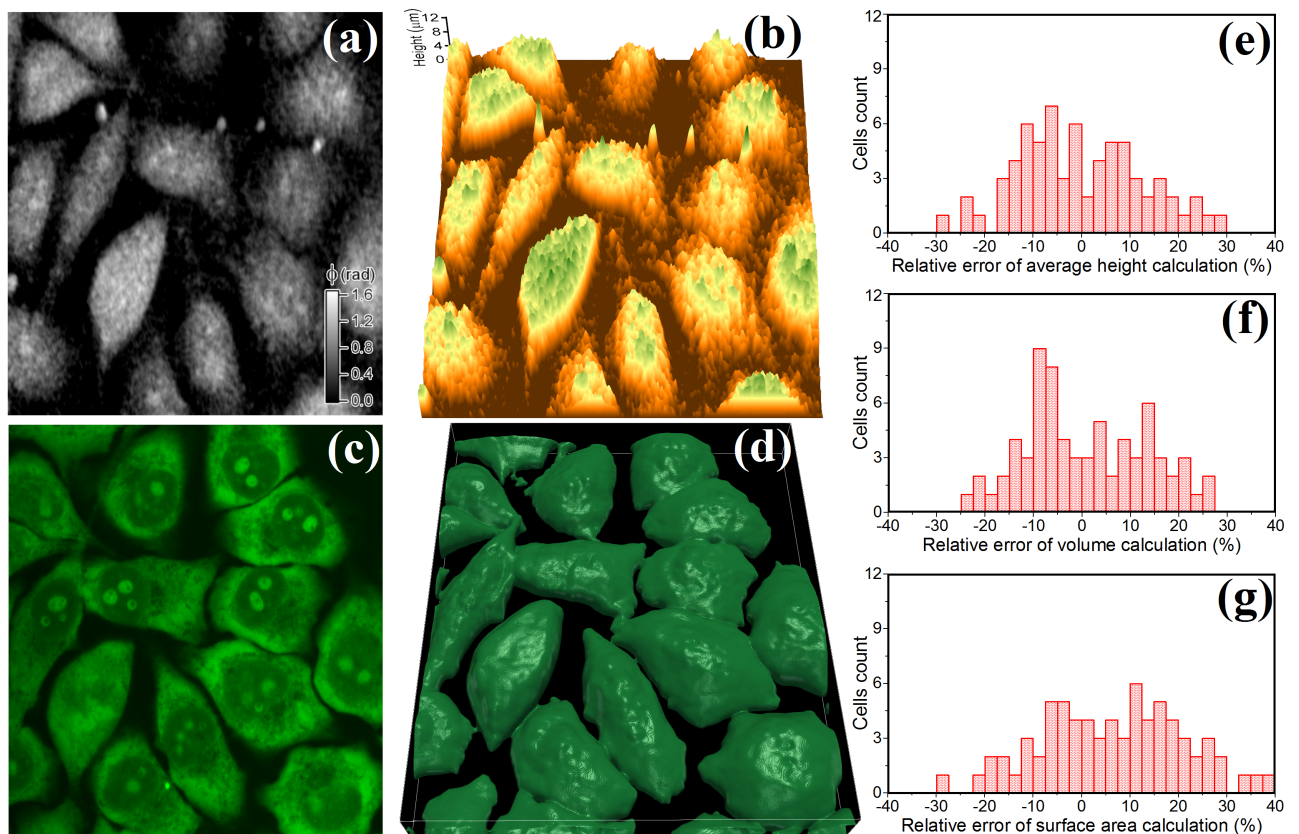


Рисунок 4.3 — Примеры изображений клеточных структур в образце фиксированных клеток линии HeLa в одном и том же поле зрения, полученных с помощью цифровой голографической и конфокальной флуоресцентной микроскопии. (a) пространственное распределение фазового запаздывания, полученное с помощью голографической микроскопии, и (b) рассчитанное из фазового запаздывания распределение высоты клеток; (c) поперечное сечение XY флуоресцентного изображения, полученное с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, (d) 3D-изображение полученное из серии поперечных срезов флуоресцентных изображений. (e–g): статистические распределения относительных ошибок средней высоты клеток h_{av} (e), объема V (f) и площади поверхности S_{surf} (g).

и определения их оптических и морфологических параметров был использован для исследования влияния фотодинамического воздействия с ФС Радахлорин на различные клеточный структуры и для разработки метода оценки эффективности этого воздействия.

Для разработки метода оценки эффективности запуска гибели клеток проводился длительный голографический мониторинг и анализ динамики оптических параметров клеток с разной степенью устойчивости к ФДТ. В экспери-

ментах использовались живые клеточные структуры культур, приготовленных из фрагментов опухолевой ткани, полученных хирургическим путем у пациентов НМИЦ онкологии им. Петрова со злокачественными новообразованиями: карциномой почки, остеосаркомой и саркомой мягких тканей и меланомой. После механической дезагрегации тканевых образцов в аппарате Medimashin (Дако, Дания) клеточную суспензию пропускали последовательно через систему фильтров Filcon 70 и 50 мкм (BD Bioscience, США), после чего помещали в питательную среду DMEM/F12 с 20% телячьей эмбриональной сыворотки, содержащей глутамин (365 мг/л), инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл) (Invitrogen, США), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) (Sigma, США) и непрерывно культивировали при 5% CO₂, 100% влажности во флаконах по методу Freshney [213]. После достижения монослоя клетки пересеивали, используя раствор, состоящий из равных долей 0,25% трипсина и версена (Биолот, Россия). Культивировали клетки непрерывно не менее 10 пассажей.

Моделирование процесса фотодинамической терапии с ФС Радахлорин проводилось на клетках раковых новообразований трех типов, полученных из опухолей пациентов с карциномой почки (RC-1, RC-2, RC-3); саркомами: остеосаркомой (STBS-O1), липосаркомой (STBS-L1, STBS-L2), синовиальной саркомой (STBS-S), альвеолярной саркомой (STBS-A) и тремя образцами клеток меланомы (Mel-1, Mel-2, Mel-3), с разной степенью устойчивости к данному виду терапии. В чашку Петри с монослоями исследуемой клеточной культуры добавлялся ФС Радахлорин в концентрации 12,25 мкг/мл, далее клетки инкубировались в растворе с ФС в течение 2 часов при постоянной температуре 37°C. Накопление Радахлорина в клетках было подтверждено в ходе контрольных экспериментов на флуоресцентном конфокальном микроскопе, демонстрирующих наличие сигнала флуоресценции Радахлорина во внутриклеточном пространстве. После накопления ФС питательная среда заменялась на чистую, во избежание генерации активных форм кислорода во внеклеточном пространстве.

Оптические параметры клеточных структур разной степени устойчивости к ФДВ исследовались в цифровом голографическом микроскопе. Необходимо отметить, что для регистрации голограмм использовался He-Ne лазер с малой плотностью мощности излучения 50 мкВт/см² на длине волны $\lambda = 633$ нм, которая лежит вне полосы поглощения Радахлорина (см. рисунок 1.4) и

соответственно не приводит к генерации активных форм кислорода. Однако, для подтверждения малоинвазивности используемой методики были проведены контрольные эксперименты на цифровом голографическом микроскопе на клетках без введения и при введении в них ФС Радахлорин. Примеры фазовых изображений и распределений среднего по площади фазового запаздывания, индуцированного клеточными структурами до и после 2 часов мониторинга в голографическом микроскопе, в разных образцах представлены на рисунке 4.4. Стоит отметить, что непрерывное облучение образцов регистрирующим лазером с малой плотностью мощности излучения в голографическом микроскопе не приводит ни к оптическим, ни к морфологическим изменениям клеток.

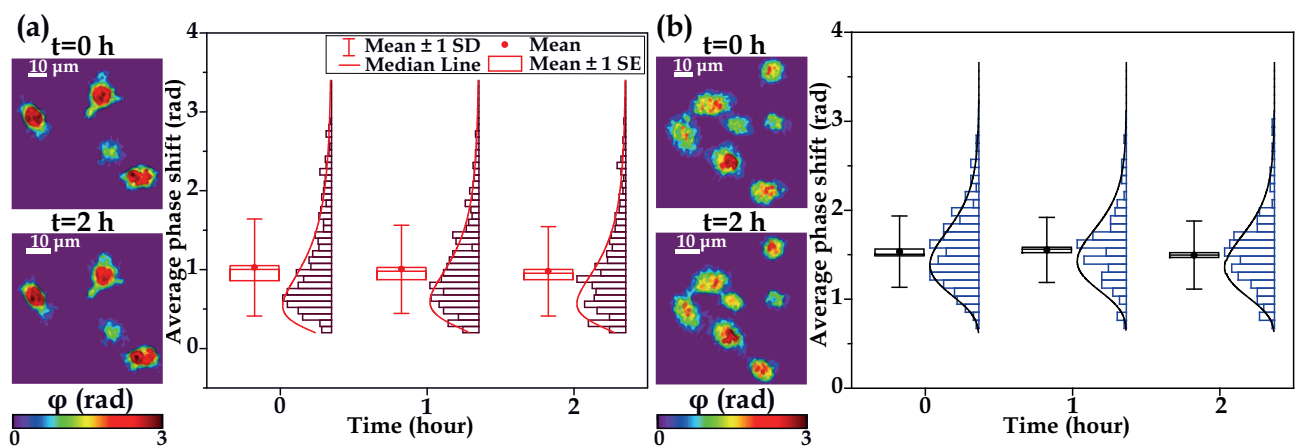


Рисунок 4.4 — Диаграммы размаха и гистограммы распределения среднего по площади фазового запаздывания, индуцированного клетками, которые не подвергались фотодинамическому воздействию с Радахлорином, при их наблюдении в голографическом микроскопе в течение 2 часов, а также их репрезентативные фазовые изображения. (а) Живые клетки STBS-A при введении во внутриклеточную среду Радахлорина и (б) клетки RC-2 без Радахлорина. SE - стандартная ошибка среднего, SD - стандартное отклонение, линии огибающей на гистограммах - логнормальное распределение

В ходе голографического мониторинга для определения оптических и морфологических параметров клеток до ФДВ, проводилась регистрация контрольных голограмм по всей площади образца в голографическом микроскопе. Далее моделировался процесс ФДТ, в ходе которого клетки облучались однородным пучком непрерывного лазера на длине волны 660 нм, соответствующей пику полосы поглощения Радахлорина (см. рисунок 1.4), с плотностью мощности

100 мВт/см² в течение 7 минут. Облучение запускало процесс генерации активных форм кислорода, приводящий к гибели клеток с разной эффективностью в зависимости от их устойчивости к ФДВ. Сразу после облучения и через каждые 5 минут проводились измерения оптических параметров клеток по всей площади образца в голографическом микроскопе. Автоматическая обработка экспериментальных данных позволила получить динамики изменения среднего фазового запаздывания, индуцированного более чем 200 клетками в каждом образце (рисунок 4.5).

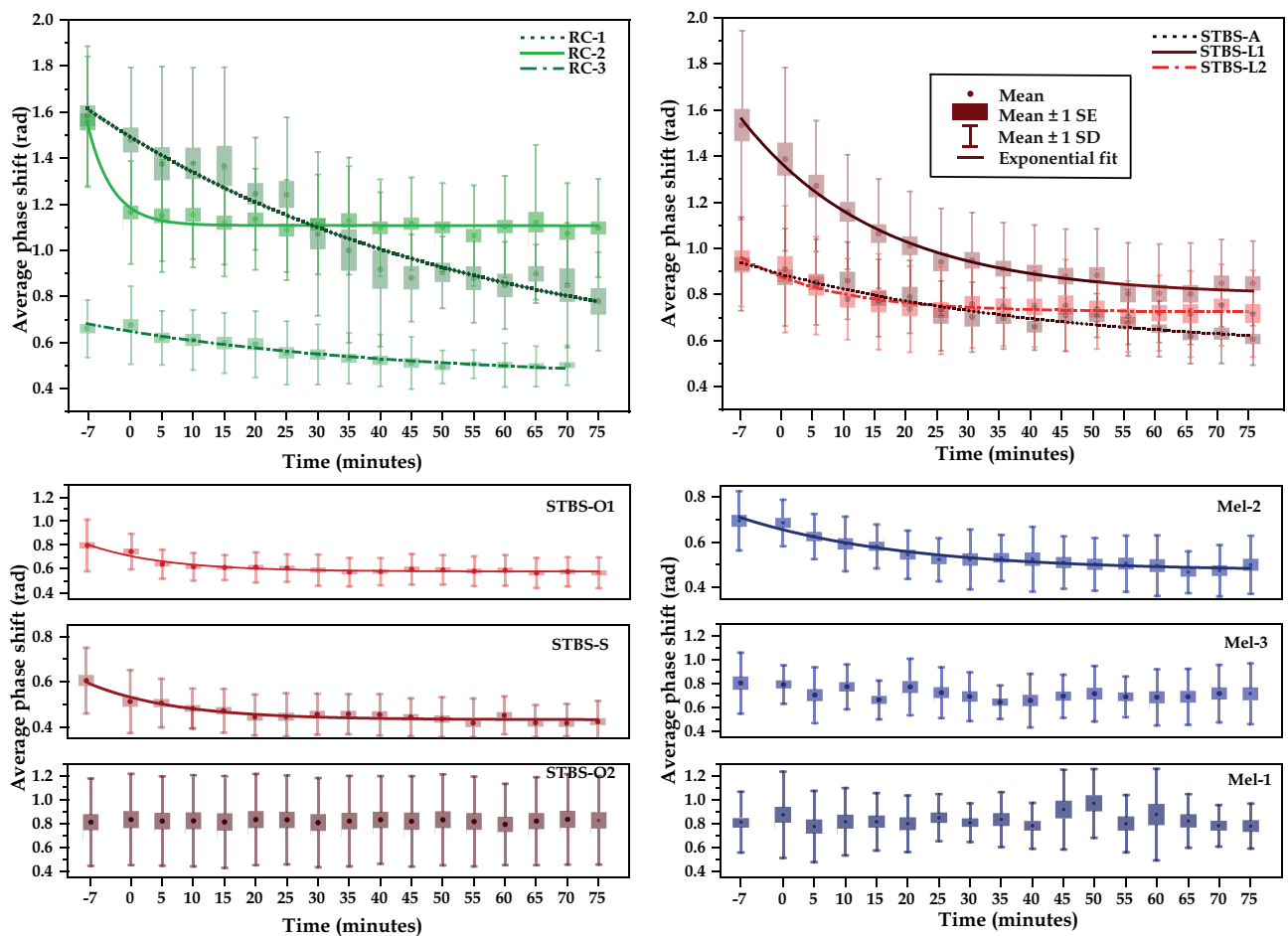


Рисунок 4.5 — Динамики изменения среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками разных образцов в проходящий волновой фронт в ходе ФДВ с Радахлорином. Значения при $t=-7$ мин соответствуют данным, полученным до ФДВ на клеточные структуры. Линии представляют собой результат одноэкспоненциальной подгонки экспериментальных динамик среднего фазового запаздывания.

Как видно из рисунка 4.5, полученные динамики фазового запаздывания, индуцированного клетками разных образцов при ФДВ с Радахлорином, суще-

ственно различаются. Можно выделить два типа динамик изменения среднего фазового запаздывания: уменьшение, статистически подтвержденное тестом Манна-Уитни с $p < 0,01$ при сравнении выборок данных, полученных до и через 80 минут после ФДВ, а также отсутствие статистически значимых изменений. Уменьшение среднего фазового запаздывания в результате ФДВ с Радахлорином наблюдалось при исследовании образцов RC-1, RC-2, RC-3 карциномы почки (рис. 4.5 (а)), большинства образцов сарком, за исключением клеток остеосаркомы STBS-O1 (рис. 4.5 (b,c)) и только для одного образца из трех меланом Mel-2 (рис. 4.5 (d)). Остальные три образца клеточных структур: одна остеосаркома (STBS-O2) и две меланомы (Mel-1, Mel-3) не демонстрировали каких-либо статистически значимых изменений среднего фазового запаздывания в течение 75 минут после ФДВ (рис. 4.5 (c,d)).

Как отмечалось ранее в разделе 1.4 из фазовых изображений клеточных структур можно определить ряд параметров, в частности сухую массу клеток (массу обезвоженной клетки) по формуле 1.4. Рассчитанные динамики изменения сухой массы клеток в результате ФДВ для каждого образца представлены на рисунке 4.6. Стоит отметить, что исходные значения (до облучения при $t = -7$ мин) как среднего фазового запаздывания, так и сухой массы клеток, полученных из разных раковых опухолей существенно отличались.

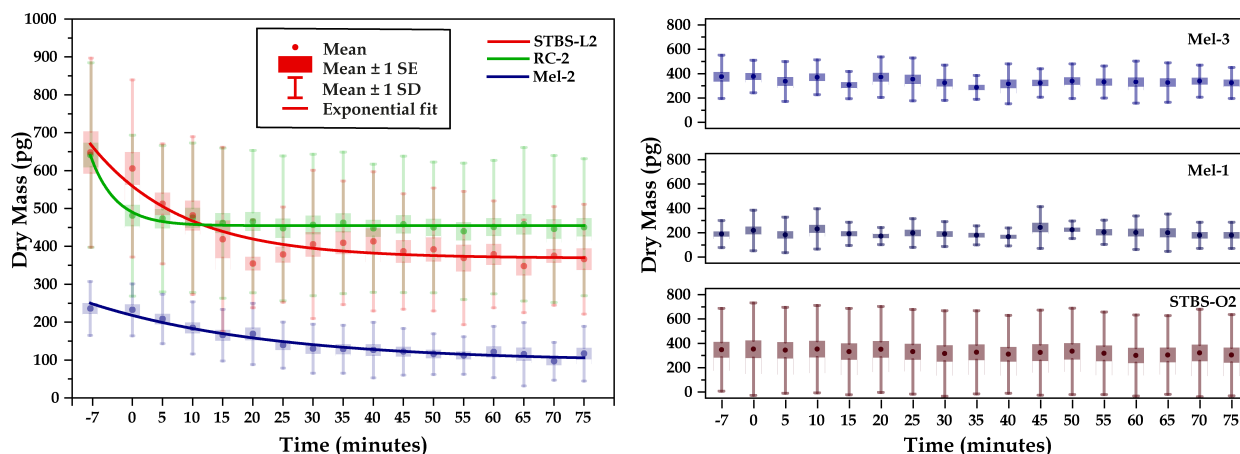


Рисунок 4.6 — Динамики изменения сухой массы клеток до и после ФДВ с Радахлорином. Значения при $t = -7$ мин соответствуют данным, полученным до ФДВ. Линии представляют собой результат одноэкспоненциальной подгонки экспериментальных динамик сухой массы клеток.

Основываясь на опубликованных результатах по голографическому мониторингу клеточных структур в ходе внешнего воздействия [135] (см. рисунок

1.8 в разделе 1.4) можно утверждать, что наблюдаемые динамики уменьшения среднего фазового запаздывания и сухой массы клеток связаны с их гибелью путем некроза. Постоянство же наблюдаемых величин свидетельствует о выживании клеток. При этом, наблюдение за клетками разных образцов с помощью оптического микроскопа подтверждает выводы, сделанные на основе динамик φ_{av} и DM. У образцов, соответственно, наблюдались либо характерные признаки некроза - разрушение мембраны и вытекание внутриклеточного содержимого, либо отсутствие каких-либо изменений. Наблюдаемая разница в реакции клеток на ФДВ с Радахлорином при одинаковых условиях свидетельствует об их различной устойчивости (резистентности) к данному виду воздействия.

Известно, что в ходе некроза клеток происходит разрыв плазматической мембраны и вытекание внутриклеточной среды, что проявляется также в уменьшении сухой массы клетки и индуцированного ею среднего фазового запаздывания [135]. Полученные динамики изменения сухой массы и среднего по площади фазового запаздывания в образцах с разной устойчивостью к ФДВ были использованы для оценки скорости протекания описанных выше процессов, характеризующих некроз клеток. В предположении, что уменьшение количества внутриклеточного вещества пропорционально разнице его концентрации внутри и снаружи плазматической мембраны клетки и что площади отверстий в ней не изменяются с течением времени, выражение, описывающее потерю сухой массы клетки, может быть записано в виде:

$$DM(t) = A + (B - A) \cdot e^{-kt} \quad (4.1)$$

Параметры B и A обозначают, соответственно, начальное и конечное значения сухой массы клетки, а k - скорость ее уменьшения. Аналогичное выражение было использовано для моделирования динамики среднего фазового запаздывания. Также был определен и проанализирован параметр $F = (B - A)/B$, характеризующий относительную потерю внутриклеточного вещества. Зарегистрированные динамики изменения φ_{av} и DM были подогнаны указанной выше функцией, результат подгонки показан на графиках 4.5 и 4.6 сплошными линиями, а вычисленные параметры приведены в таблице 5. Точность подгонки контролировалась с помощью скорректированного коэффициента детерминации R^2 [214], для всех полученных динамик это значение было не менее 0,88.

Таблица 5 — Параметры, полученные в результате подгонки динамики среднего фазового запаздывания φ_{av} , индуцированного клетками в проходящий волновой фронт, и сухой массы клеток DM функцией 4.1. A - конечные значения φ_{av} и DM, k - характерное время уменьшения среднего фазового запаздывания и сухой массы, F - параметр, характеризующий потерю φ_{av} и DM клетки до и после ФДВ с Радахлорином.

Образец	Среднее фазовое запаздывание (φ_{av})			Сухая масса (DM)		
	k, мин ⁻¹	A, рад	F, %	k, мин ⁻¹	A, пг	F, %
Mel-2	0,043	0,49	31,39	0,033	95,77	61,65
STBS-L1	0,045	0,79	49,03	0,027	330,83	50,02
STBS-L2	0,068	0,73	24,48	0,066	368,69	44,98
STBS-O1	0,081	0,58	28,25	0,107	118,57	48,49
STBS-S	0,072	0,43	27,5	0,077	129,72	51,41
STBS-A	0,025	0,62	33,84	0,047	134,01	35,71
RC-1	0,016	0,49	69,9	0,032	424,72	29,69
RC-2	0,253	1,11	28,84	0,0238	454,45	28,98
RC-3	0,021	0,44	35,33	0,042	103,08	42,57

Как видно из таблицы 5, характерные скорости k уменьшения среднего фазового запаздывания и сухой массы значительно различаются для клеток, полученных из опухолей одного типа, но от разных пациентов. Наиболее заметная разница в скорости k уменьшения среднего фазового запаздывания наблюдалась в клетках карциномы почки RC-1 и RC-2, для которых соотношение значений k_{RC-2}/k_{RC-1} составило приблизительно 15,8. Вместе с тем, параметр F уменьшения среднего фазового запаздывания варьировался от $\approx 29\%$ для образца RC-2 до $\approx 70\%$ для RC-1. В клетках саркомы эти параметры изменялись не так сильно и были оценены как $k_{STBS-O1}/k_{STBS-A} \approx 3,2$, а максимальное изменение δF около 25%. Разница в скоростях протекания процесса некроза, характеризующегося вытеканием внутриклеточной среды, в клетках опухолей одного типа также наблюдалась в ходе мониторинга в оптическом микроскопе.

Изменение плотности мощности возбуждающего непрерывного лазера, инициирующего генерацию активных форм кислорода, приводит к изменению интенсивности фотодинамического воздействия и, соответственно, должно приводить к изменению скорости протекания клеточных изменений, что и было далее проверено с помощью голографического мониторинга клеточных параметров. В последующей серии экспериментов плотность мощности возбуждающего

молекулы ФС лазера была уменьшена со 100 мВт/см^2 до 25 и 50 мВт/см^2 при сохранении времени облучения равном 7 минут. Клетки образцов RC-1 и RC-2 карциномы почки, которые продемонстрировали значительно различающиеся динамики изменения φ_{av} и DM, были исследованы до и после ФДВ с Радахлорином. Полученные динамики изменения среднего фазового запаздывания при разных плотностях мощности облучения в образцах RC-1 и RC-2 и их подгонки одноэкспоненциальной функцией согласно формуле 4.1 представлены на рисунке 4.7. Как видно из представленных на рис. 4.7 динамиках, уменьшение плотности мощности приводило к снижению скорости изменения φ_{av} и DM, что подтверждает возможность голографического мониторинга как метода оценки скорости протекания некроза и соответственно определения чувствительности индивидуальной культуры клеток к внешнему воздействию.

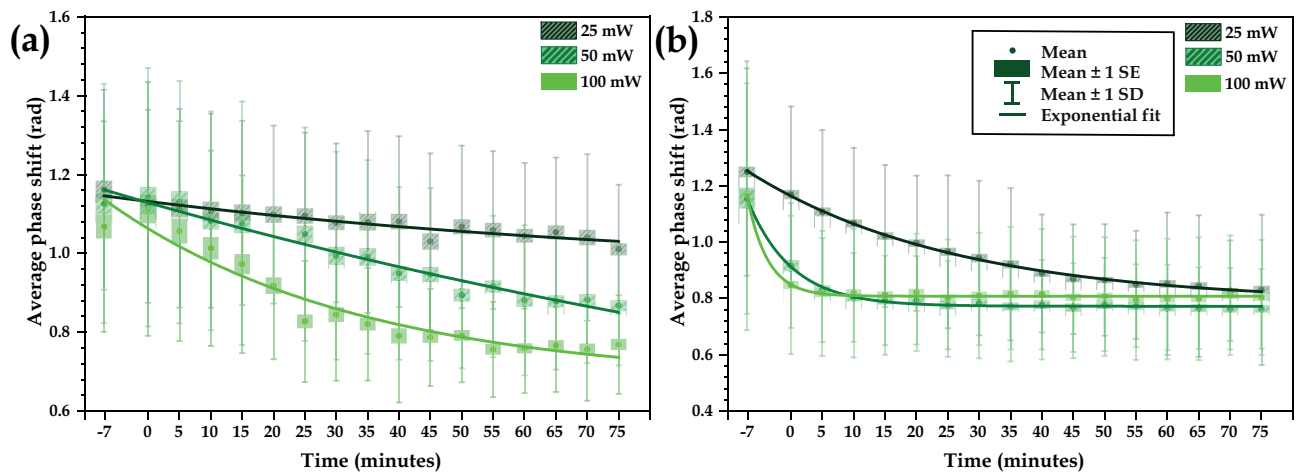


Рисунок 4.7 — Динамики изменения среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками образцов RC-1 (a) и RC-2 (b), до и после ФДВ с Радахлорином, при разных плотностях мощности облучения 25, 50 и 100 мВт/см^2

Помимо исследования изменений среднего фазового запаздывания и сухой массы клетки, происходящих в результате ФДВ с помощью голографической микроскопии, интерес также представляет использование цифровой голографической томографии, позволяющей получать стереометрические параметры клетки, а также абсолютные значения показателя преломления клеточных структур. Аналогично цифровой голографической микроскопии, голографическая томография является малоинвазивным методом, не требует введения посторонних веществ и позволяет проводить мониторинг клеток с низкой плотностью мощности лазерного излучения. Данный метод исследования предпо-

лагает последовательную регистрацию нескольких десятков внеосевых цифровых голограмм, соответствующих различным углам падения волнового фронта на исследуемый объект. В результате математической обработки полученных распределений интегрального фазового запаздывания происходит восстановление трехмерного распределения показателя преломления исследуемого объекта [215]. Полученный трехмерный массив в дальнейшем может быть использован для точного определения основных морфологических характеристик клеток, а также для исследования их внутреннего строения.

Для более детального исследования изменения клеток образца карциномы почки RC-2 до и после ФДВ с Радахлорином использовался голографический томографический микроскоп Nanolive 3D Cell Explorer (Nanolive, Швейцария), в котором длина волны регистрирующего лазера (533 нм) лежит за пределами полосы поглощения Радахлорина (см. рис. 1.4). Клетки образца RC-2 подвергались ФДВ при тех же условиях, что и при исследовании на голографическом микроскопе: плотность мощности облучения составляла 100 мВт/см^2 , клетки облучались в течение 7 минут. Пример нескольких поперечных XY сечений трехмерного распределения показателя преломления клеток карциномы почки образца RC-2 до и после ФДВ с Радахлорином, представлен на рисунке 4.8.

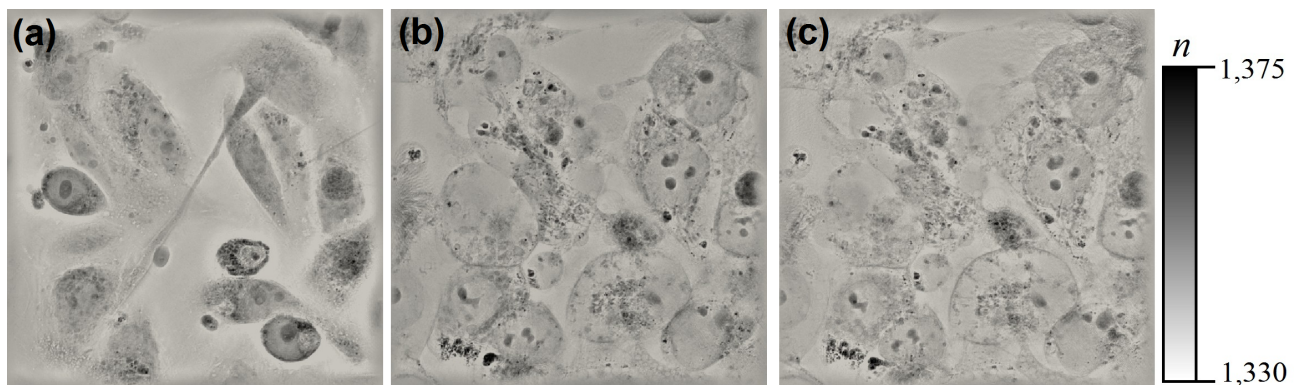


Рисунок 4.8 — Поперечные сечения XY трехмерных распределений показателя преломления в клетках образца RC-2 (a) - до , (b) - через 15 и (c) - через 30 минут после ФДВ с Радахлорином.

Использование голографического томографического микроскопа позволило реконструировать трехмерные распределения показателя преломления клеток до и после ФДВ с Радахлорином. Дальнейший численный анализ экспериментальных данных позволил отследить динамику изменения не только показателя преломления внутриклеточной среды, но и средней высоты клеток до и после ФДВ с Радахлорином. Усредненные по выборке из 50 клеток образца

RC-2 значения средней высоты клеток до и через 30 и 60 минут после ФДВ представлены на рисунке 4.9 (а). Как видно, средняя высота клеток уменьшается в течение часа после ФДВ, что также подтверждает протекание процессов некроза в результате ФДВ с используемой дозой, сопровождающегося разрывом мембраны и вытеканием внутриклеточной среды.

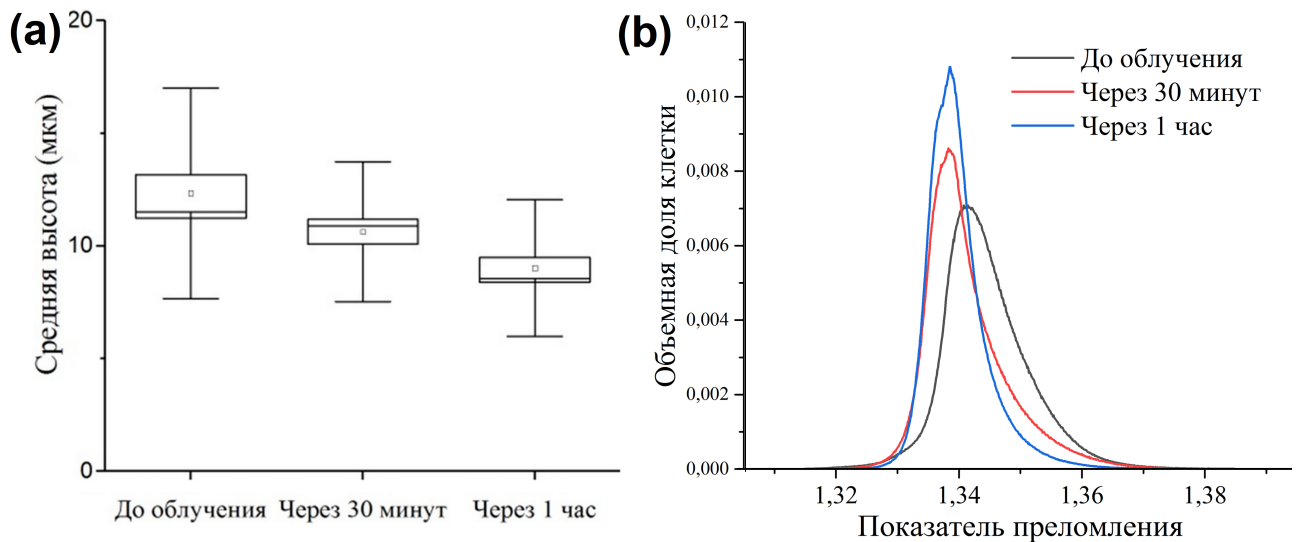


Рисунок 4.9 — (а) Средняя высота и (b) огибающие гистограмм распределения показателя преломления клеток образца RC-2 до и через 30 и 60 минут после ФДВ с Радахлорином при использовании плотности мощности возбуждающего лазера 100 мВт/см^2 .

Голографическая томография позволяет отслеживать динамику изменения показателя преломления, так на рисунке 4.9 (b) представлены огибающие гистограмм распределения показателя преломления внутри клетки карциномы почки до ФДВ и через 30 и 60 минут после него. Как видно, распределение показателя преломления клетки сдвигается в сторону уменьшения после ФДВ. Изменение показателя преломления может быть связано с трансформацией внутриклеточных структур и изменением оптических свойств клеток при их гибели путем некроза.

Таким образом, голографический и голографический томографический микроскопы позволяют всесторонне оценить изменения морфологических и оптических параметров клетки в результате ФДВ с Радахлорином. Было показано, что использование данного метода позволяет оценить эффективность ФДВ на клетки различных злокачественных опухолей путем численного анализа динамики изменений среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками в проходящий волновой фронт, и сухой массы клеток.

4.3 Разработка автоматического определения отклика клеток на фотодинамическое воздействие на основе параметров, полученных голографическим методом

Исследования изменений оптических и морфологических параметров клеток в результате ФДВ с Радахлорином при разных дозах, запускающих разные типы клеточной гибели с разными скоростями протекания, проводились ранее и были сопоставлены со стандартно применяемыми флуоресцентными методами определения путей гибели клеток [135] (см. разделы 1.4 и 4.2). Так известно, что клеточная гибель путем апоптоза (программируемая гибель клетки) при ФДВ с Радахлорином характеризуется увеличением среднего фазового запаздывания, так как в ходе этого процесса происходит округление и обезвоживание клетки с образованием мелких пузырей на мембране, что приводит к увеличению как показателя преломления, так и средней высоты клетки. Для некроза клетки, при котором наблюдается разрыв мембраны и вытекание внутриклеточной среды, характерно экспоненциальное уменьшение среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками в проходящий волновой фронт. Дополнение оптических параметров клеток морфологическими характеристиками, определенными по фазовым изображениям клеток, может быть использовано для разработки алгоритмов классификации состояния клеток с высокой точностью. Разработка таких алгоритмов представлена в данной главе.

Для разработки алгоритма автоматического определения реакции клеток на ФДВ с Радахлорином были проведены серии экспериментов для определения оптических и морфологических параметров клеток трех стандартных линий, HeLa, A549 и 3T3, при различных дозах ФДВ, запускающих разные типы клеточной гибели. Эксперименты по наблюдению некроза и апоптоза, вызванного внутриклеточной генерацией активных форм кислорода, проводились на живых клетках *in vitro*. Клетки стандартизованных линий HeLa, A549 и 3T3 (коллекция клеточных линий Института цитологии РАН) культивировались в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Спустя 48 часов после посева клеток, в питательную среду добавлялся ФС Радахлорин в концентрации 5 мкг/мл, после чего, в тече-

ние 24 часов инкубации клеток в растворе фотосенсибилизатора происходила его накопление во внутриклеточной среде. Затем для исключения воздействия молекул активных форм кислорода, генерируемых вне живой клетки, среда с Радахлорином заменялась на чистую питательную среду. Далее в голографическом микроскопе, схема которого была подробно описана в разделе 4.1, проводился мониторинг фазового запаздывания, индуцированного клетками в проходящий волной фронт. Стоит отметить, что ранее в разделе 4.2 было продемонстрировано отсутствие влияния излучения He-Ne лазера, используемого для регистрации голограмм, на оптические и морфологические параметры клеток, которые инкубировались в растворе Радахлорина. После замены питательной среды на чистую, клетки в течение 5 минут освещались непрерывным лазерным излучением на длине волны 660 нм, лежащей в полосе поглощения ФС Радахлорин (см. рисунок 1.4). Таким образом, производилась фотосенсибилизированная генерация активных форм кислорода, запускающих гибель клеток, при этом изменение мощности возбуждающего лазерного излучения приводило к вариации концентрации генерируемых активных форм кислорода, что влияло на тип клеточной гибели. В работе использовались плотности мощности возбуждающего излучения 22 мВт/см², 46 мВт/см² и 10 мВт/см² для запуска гибели путем апоптоза клеток линии HeLa, A549 и 3T3, соответственно. Некроз клеток инициировался при использовании плотности мощности возбуждающего 660-нм лазера 100 мВт/см², 130 мВт/см² и 160 мВт/см² для клеток линии HeLa, A549 и 3T3, соответственно. Далее в голографическом микроскопе регистрировались голограммы клеточных структур каждые 5 минут в течение 80 минут, из этих голограмм восстанавливались фазовые изображения клеток и вычислялись их оптические и морфологические параметры. Фазовые изображения клеток и динамики изменения среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками 3T3 в проходящий волновой фронт, для разных плотностей мощности возбуждающего 660-нм лазера представлены на рисунке 4.10. Эти динамики аналогичны динамикам изменения среднего фазового запаздывания клеток линий HeLa и A549 при разных путях гибели и различных дозах ФДВ, представленных в работе [135].

Несмотря на подтвержденную флуоресцентными методами однозначную зависимость динамики изменения среднего фазового запаздывания в ходе гибели клеток при ФДВ с Радахлорином [134], интересно получить информацию

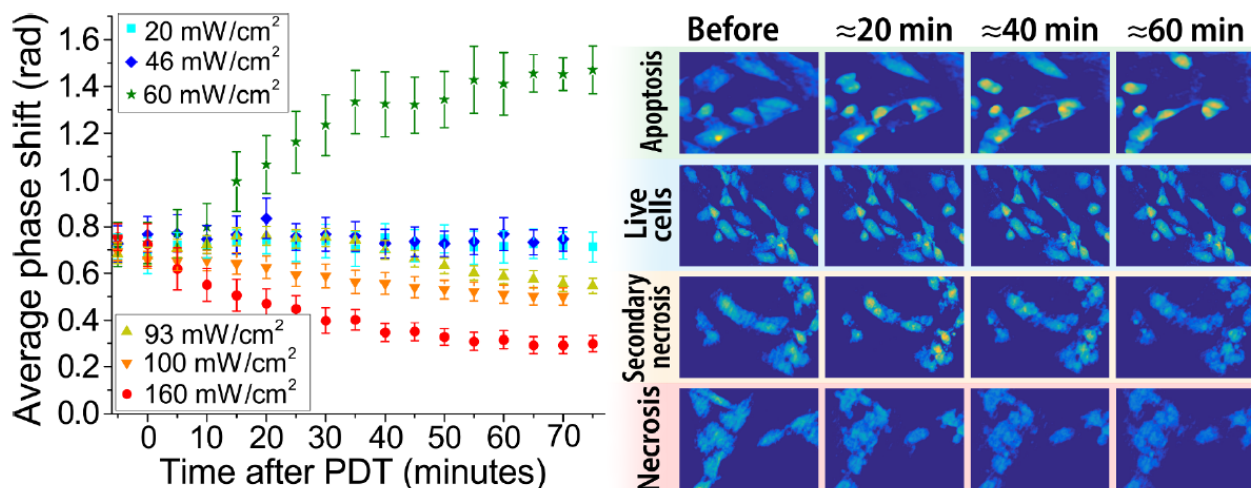


Рисунок 4.10 — Слева: динамики изменения среднего фазового запаздывания, индуцированного клетками ЗТЗ в проходящий волновой фронт, для разных плотностей мощности возбуждающего 660-нм лазера. Справа: Типичные фазовые изображения клеток линии ЗТЗ в разные моменты времени после ФДВ с Радахлорином при плотностях мощности 20, 60, 93 и 160 мВт/см² возбуждающего 660-нм лазера.

о состоянии конкретной клетки в определенный момент времени. Для этого на основе оптических и морфологических параметров клеток в разных состояниях был разработан алгоритм автоматической классификации состояния клетки на основе ее фазового изображения. В основу алгоритма легли фазовые изображения более чем 400 клеток в состояниях: живая, погибшая путем некроза или апоптоза, в результате воздействия с ФС Радахлорин. В работе были использованы фазовые изображения, полученные через 60 минут после ФДВ с Радахлорином при соответствующей плотности мощности облучения, инициирующего разные типы гибели клеток. Типичные фазовые изображения клеток трех разных линий в трех состояниях (живые, погибшие путем некроза или апоптоза) представлены на рисунке 4.11.

Из дискретных распределений фазового запаздывания $\Delta\phi(x,y)$, индуцированных клетками, которые подверглись ФДВ с Радахлорином с разными дозами облучения, и, соответственно, погибших различными путями гибели, вычислялись параметры клеток [147]:

- Площадь проекции S_{pr}

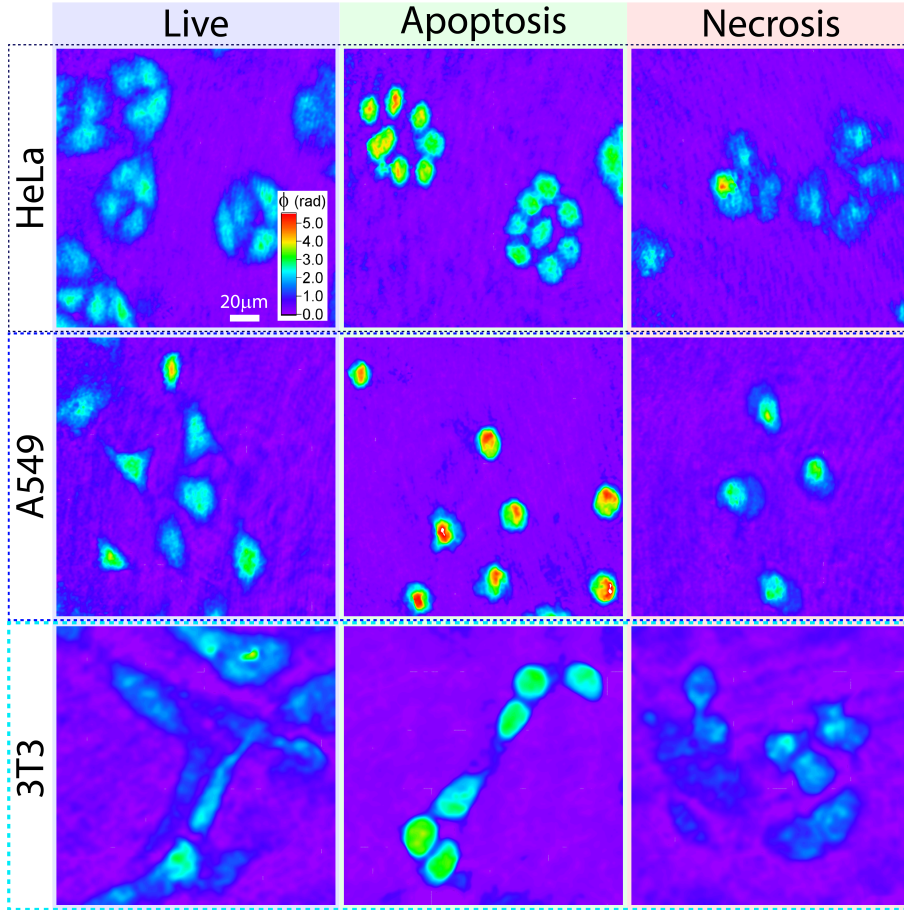


Рисунок 4.11 — Типичные пространственные распределения фазового запаздывания, индуцированного в проходящий волновой фронт клетками линий HeLa, A549 и 3T3 в разных состояниях

- Средний по площади прикрепления клетки фазовое запаздывание, индуцированное ею в проходящий волновой фронт $\Delta\varphi_{av} = \int_{S_{pr}} \Delta\phi(x,y) dx dy / S_{pr}$
 - Сухая масса клетки $DM = \frac{\lambda}{2\pi\alpha} \int_{S_{pr}} \Delta\phi(x,y) dx dy$, пропорциональная фазовому объему клетки $V^{phase} = \int_{S_{pr}} \Delta\phi(x,y) dx dy$
 - Фазовая площадь поверхности без площади прикрепления $S_{TopSurf}^{phase} = \sqrt{1 + \delta h_x^2 + \delta h_y^2}$, где $\delta h_i = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{\partial \Delta\phi(x,y)}{\partial i}$ при $i = x, y$
 - Фазовая площадь мембраны (вся фазовая площадь поверхности) $S_{membr}^{phase} = S_{pr} + S_{TopSurf}^{phase}$
- Параметры, характеризующие форму клетки:*
- Индекс сферичности фазового объема $\psi = 6\pi^{\frac{1}{3}} (V^{phase})^{\frac{2}{3}} / S_{membr}^{phase}$

- Эксцентриситет клетки, определенный как $\varepsilon = \frac{r_{max}-r_{min}}{r_{max}+r_{min}}$, где r_{max} и r_{min} - это максимальный и минимальный радиусы изображения клетки
- Статистические параметры распределения фазового запаздывания $\Delta\phi(x,y)$ внутри грании клетки:*
- Дисперсия распределения фазового запаздывания $\sigma_{\varphi(x,y)}$
- Коэффициент эксцесса распределения фазового запаздывания *Kurtosis $_{\varphi}$*
- Коэффициент асимметрии распределения фазового запаздывания *Skewness $_{\varphi}$*

В ходе работы была получена обширная база данных для разработки алгоритма классификации различных состояний клеток (живая/погибшая путем некроза/апоптоза) на базе анализа перечисленных параметров. Вначале, описанный в разделе 4.1 алгоритм автоматического определения границ клеток на их фазовых изображениях был использован для сегментации более 400 клеток каждой линии (HeLa, A549, ЗТЗ) для трех разных состояний, вызванных ФДВ с Радахлорином. Далее, для каждой клетки в известном состоянии были определены перечисленные оптические и морфологические параметры, на основе которых проводилась разработка алгоритма классификации. На рисунке 4.12 (а-с) представлены диаграммы рассеяния, где каждой клетке определенной линии в определенном состоянии (живая - синий цвет, погибшая путем апоптоза - зеленый или некроза - красный) соответствует точка, координаты которой равны значениям двух ее параметров, указанных по осям абсцисс (среднее фазовое запаздывание) и ординат (сухая масса клетки). На рисунке 4.12 (d) представлена диаграмма рассеяния в осях φ_{av} и DM^{cell} для живых клеток разных линий (HeLa, A549 и ЗТЗ)

Как видно на представленных распределениях 4.12 (а-с), выборки клеток в разных состояниях могут быть разделены на группы по вычисленным двум клеточным параметрам. Так, клетки, погибшие путем некроза, имеют меньшие сухую массу и среднее фазовое запаздывание, чем нормальные и апоптотические клетки. Однако для повышения точности классификации состояния клеток были проанализированы выборки всех 10 клеточных параметров, полученных голографическим методом при мониторинге 9 типов образцов клеток (клетки трех линий в трех различных состояниях). Полученная в ходе работы база данных восстановленных параметров содержала информацию о более чем 400

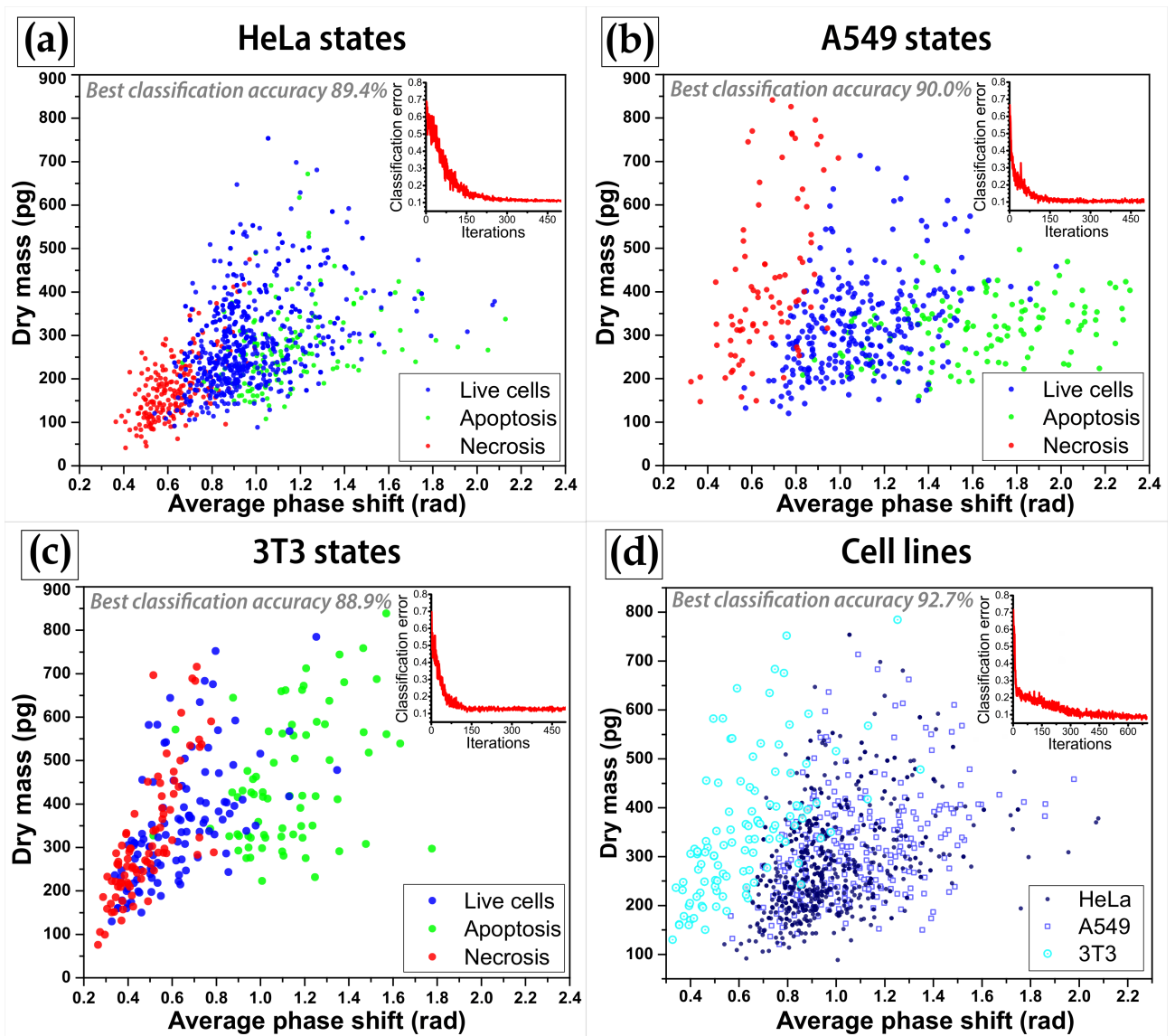


Рисунок 4.12 — Диаграммы рассеяния в осях среднего фазового запаздывания, индуцированного клеткой в проходящий волновой фронт, и её сухой массы для клеток (а-с) HeLa, A549 и 3T3 в нормальном состоянии (синие точки), подвергшихся некрозу (красные точки) или апоптозу (зеленые точки), (d) живых клеток этих трёх линий

клетках трех линий в состояниях: живая, погибшая путем апоптоза или некроза. База голографических параметров использовалась для обучения нескольких классификаторов, при этом 20% от исходного набора данных использовалось для оценки точности алгоритма классификации. Для классификации состояния клеток разных линий с использованием собранной базы данных были применены три типа классификаторов машинного обучения, которые были успешно использованы ранее для классификации объектов при голографическом мониторинге [171; 216] и в данной работе показали наилучшую точность классифи-

кации: (1) метод опорных векторов (SVM) с квадратичным ядром, (2) метод взвешенных k-ближайших соседей (k-NN), (3) классификатор, который создает ансамбли (ЕС) деревьев решений с использованием алгоритма AdaBoost. Алгоритм классификации был разработан при использовании пакета прикладных программ MatLab. Оценки точности определения состояния клеток представлены в таблице 6 для каждого алгоритма, используемого для классификации состояния клеток конкретной клеточной линии (1-3 строки таблицы), определения клеточной линии живых клеток (4 строка таблицы) и классификации между всеми тремя состояниями трех разных клеточных линий (5 строка таблицы).

Таблица 6 — Точность классификации состояний клеток клеточных линий HeLa, A549 и 3T3, и состояний клеток среди трех клеточных линий с использованием алгоритмов машинного обучения SVM (метод опорных векторов), k-NN (метод k-ближайших соседей) и ЕС (ансамбли деревьев решений).

Классификация между	SVM	k-NN	ЕС
клетками линии HeLa в разных состояниях	89.4%	84.4%	85.0%
клетками линии A549 в разных состояниях	90.0%	89.0%	82.0%
клетками линии 3T3 в разных состояниях	88.9%	82.7%	83.9%
живыми клетками трех линий	92.7%	78.1%	81.7%
клетками трех линий в разных состояниях	77.8%	66.5%	66.9%

Стоит отметить, что классификация была реализована на основе 10 параметров, полученных из фазовых изображений, при этом некоторые из них взаимозависимы и не все вносят равный вклад в классификацию объектов. Так, некоторые параметры в большей степени способствуют определению клеточной линии, но не состояния клетки. Анализ разработанных алгоритмов классификации показал, что наиболее важными параметрами для классификации состояния клеток являются среднее фазовое запаздывание φ_{av} , сухая масса клетки DM^{cell} , площадь проекции S_{pr} , фазовая площадь поверхности без площади прикрепления $S_{TopSurf}^{phase}$ и коэффициент эксцесса распределения фазового запаздывания, индуцированного клеткой $Kurtosis_{\varphi}$ (в порядке убывания вклада в точность классификации). Например, классификация среди 3 линий живых клеток с помощью SVM продемонстрировала увеличение точности с 50,2% (основанной

исключительно на среднем фазовом запаздывании) до 78% и 92% в случаях, соответственно, 5 параметров, перечисленных выше, и всех 10 параметров.

Определение клеточной линии по параметрам живых клеток было выполнено с помощью трех алгоритмов классификации машинного обучения, точность классификации которых составила 92,7%, 78,1% и 81,7% для SVM, k-NN и ЕС, соответственно. Те же подходы были применены для классификации живых, апоптотических и некротических клеток в пределах каждой клеточной линии HeLa, A549 и 3T3. При этом, точность классификации состояний клеток варьировалась в пределах 84-89% для HeLa, 82-90% для A549 и 83-89% для 3T3 (см. таблицу 6). Наивысшая точность была достигнута для всех клеточных линий с помощью алгоритма SVM. Точность классификации алгоритмов по всей базе данных, содержащей информацию обо всех трех состояниях трех клеточных линий, составила около 78% для SVM и около 67% как для k-NN, так и для ЕС. Таким образом, наибольшая точность классификации как клеточной линии, так и состояний клеток была получена при использовании алгоритма классификации SVM с квадратичной функцией ядра.

Вместе с тем, для демонстрации преимущества голографического мониторинга клеток для классификации типа и состояния клеток на основе их оптических и морфологических параметров, те же алгоритмы классификации были использованы при обучении их только на морфологических параметрах клеток, которые можно было рассчитать по изображениям, полученным с помощью обычной оптической микроскопии. Так, из 2D-амплитудных изображений (без учета значений фазового запаздывания) можно вычислить: (1) площадь проекции клетки S_{pr} , (2) проецируемый периметр клетки P_{pr} , (3) округлость клетки, рассчитанную как $(4\pi S_{pr})/P_{pr}^2$, (4) эксцентриситет клетки, определенный как ε , (5) целостность клетки (solidity), определяемую как отношение обычной и выпуклой площади (данный параметр равен единице, если объект целый и не имеет дыр и впадин, а при их появлении он уменьшается), (6) малую и большую оси проекции клетки (см. работы [147; 217; 218], где некоторые из этих параметров используется для анализа клеток). Классификация состояний клеток трех клеточных линий с использованием алгоритмов SVM, k-NN и ЕС, основанных на этом наборе морфологических параметров, продемонстрировала точность классификации в пределах 65.6–67.2%, 67.4–71.9% и 63,5–65,5%, соответственно. Точность классификации клеточной линии для живых клеток составила 64,9%,

60,1% и 59,7% соответственно. Стоит обратить внимание, что помимо обеспечения значительно более высокой точности классификации, голографическая микроскопия позволяет относительно легко сегментировать клетки с использованием численных алгоритмов, что не всегда возможно для изображений, полученных с помощью микроскопии светлого поля.

Разработанный алгоритм классификации, основанный на методе SVM, который показал наибольшую точность классификации при обучении на всех 10 клеточных параметрах, был применен для анализа отклика клеток на разные дозы ФДВ с Радахлорином. Как упоминалось ранее различные дозы ФДВ при варьировании плотности мощности облучения приводят к разным типам клеточной гибели [135; 219]. В контрольных экспериментах использовались плотности мощности возбуждающего 660-нм лазера при продолжительности облучения 5 минут, что вызывало заранее известную реакцию клеток стандартной линии HeLa[135].

Клетки линии HeLa исследовались в голографическом микроскопе в десятках полей зрения до и в течение не менее 1 ч после ФДВ с тремя определенными дозами облучения, приводившими к выживанию, некрозу и апоптозу. Фазовые изображения клеточных структур регистрировались каждые 5 минут, в ходе численной обработки изображений были вычислены параметры нескольких десятков отдельных клеток (обычно 35–40 клеток в каждой выборке). На основе голографических параметров с помощью разработанного алгоритма классификации определялось состояние каждой клетки из выборки (живая, погибающая путем некроза или апоптоза). Для каждого момента времени было вычислено относительное количество живых, апоптотических и некротических клеток HeLa. Динамика изменения долей клеток, классифицированных в разных состояниях для трех доз облучения, приводящих к выживанию, некрозу и апоптозу клеток, представлены на рисунке (а)-(с), соответственно 4.13.

Полученные динамики изменения относительной доли клеток, классифицированных в разных состояниях, указывают на значительную разницу отклика клеток HeLa на разные дозы ФДВ с Радахлорином. При относительно низкой дозе облучения (плотность мощности 10 мВт/см^2) большинство клеток, наблюдаемых через 60 мин после ФДВ, классифицировались алгоритмом как живые клетки (см рисунок 4.13 а). Наблюдаемый незначительный рост числа клеток, классифицированных как погибшие путем апоптоза, при низкой дозе

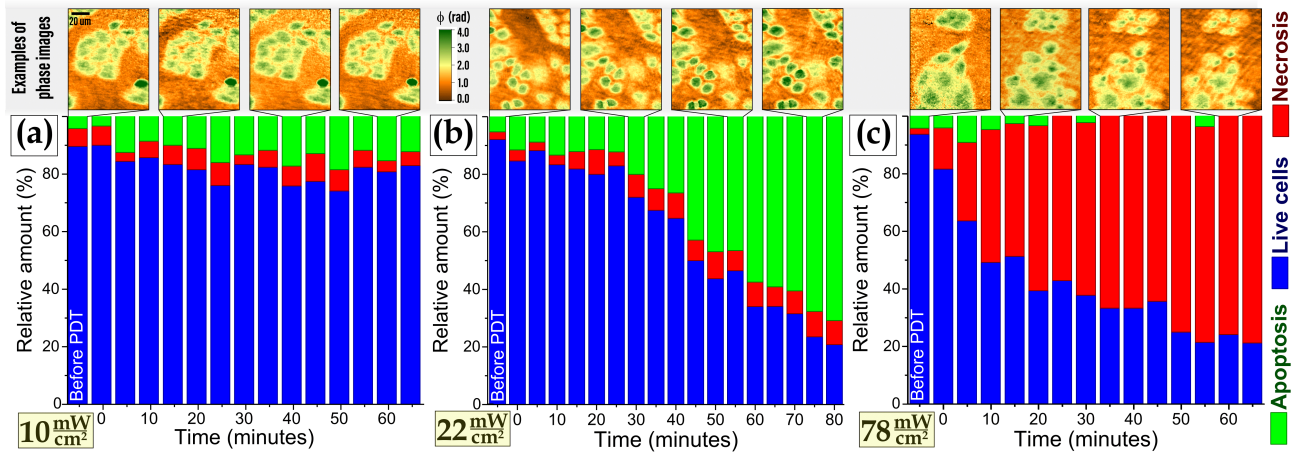


Рисунок 4.13 — Относительное количество живых, апоптотических и некротических клеток HeLa при ФДВ с Радахлорином после облучения с различными плотностями мощности 660-нм лазерного излучения, полученное в результате классификации состояния клеток с использованием алгоритма SVM: (a) 10 мВт/см², (b) 22 мВт/см², (c) 78 мВт/см². Первый столбец в каждой временной динамике представляет собой состояние клеток до облучения (живые клетки). Временная шкала отложена относительно окончания ФДВ. Примеры соответствующих фазовых изображений клеток, полученных в разные моменты времени, показаны в верхнем ряду над каждой диаграммой.

ФДВ может быть обусловлен специфическим ответом клеток HeLa с относительно низкой антиоксидантной защитой. При несколько более высокой плотности мощности возбуждения (22 мВт/см²) наблюдалось заметное увеличение относительного числа апоптотических клеток, начиная с 20-25 мин после ФДВ (рисунок 4.13b). Стоит отметить, что также наблюдалось незначительное увеличение количества клеток, классифицированных как некротические (рисунок 4.13b). Вместе с тем, высокая плотность мощности лазерного излучения (78 мВт/см²) приводила к преимущественной доле клеток, определенных как погибшие путем некроза, и быстрому увеличению этой доли (см рисунок 4.13c).

Однако, стоит обратить внимание, что из-за несовершенной классификации клеток не все клетки до ФДВ были классифицированы как живые. Также отметим, что высокая плотность мощности лазерного излучения приводила к относительно быстрому росту доли некротизированных клеток, в то время как значительное увеличение доли апоптотических клеток начиналось только через

20-25 мин после ФДВ, что может быть связано с "программируемой" природой этого процесса, требующего некоторого времени для отклика.

Эксперименты, направленные на апробацию разработанного алгоритма, показали хорошее согласие с преобладающими путями гибели клеток, подтвержденными ранее с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии и предыдущими данными об отклике клеток HeLa на ФДВ с фотосенсибилизатором Радахлорин [135; 160; 220], вследствие чего можно утверждать, что разработанный алгоритм классификации состояния клеток на основе голографических данных о клетке позволяет надежно классифицировать ее различные состояния.

Таким образом, в данной главе были 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 голографическим методом. Были проведены эксперименты по голографическому мониторингу реакции клеток солидных опухолей карциномы почки, сарком мягких тканей и меланомы на ФДВ. Показано, что использование цифровой голографической микроскопии позволяет оценить эффективность ФДВ с фотосенсибилизатором Радахлорин на клетки злокачественных опухолей путем анализа динамик среднего фазового запаздывания и сухой массы клеток. Исследование дополнительных оптических параметров клеток карциномы почки методом голографической томографии показало, что при используемой дозе облучения происходит уменьшение средней высоты клетки, что связано с разрывом мембраны и вытеканием внутриклеточной среды наружу. Зарегистрировано изменение распределений показателя преломления в клетках карциномы почки при ФДВ с Радахлорином. 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. Было показано, что цифровая голографическая микроскопия может быть использована для оценки выживаемости клеток в ходе внешнего воздействия и для определения типа клеточной гибели, что было подтверждено стандартными флуоресцентными методами.

Заключение

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 поверхностях. 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 рН и полярности растворов фотосенсибилизатора. Обнаружено, что квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин увеличивается на порядок при изменении рН 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 рН 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 рН микроокружения молекул Радахлорина. Показано, что концентрация Радахлорина в области внутриклеточного пространства, оцениваемая только по интенсивности его флуоресценции, может содержать существенные погрешности вследствие сильной зависимости 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.

Публикации по теме диссертации

Публикации в журналах, индексируемых в базе данных 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.
22. *Ogilby P. R.* Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun // Chemical Society Reviews. — 2010. — Vol. 39, no. 8. — P. 3181–3209.
23. Review of chemical reactivity of singlet oxygen with organic fuels and contaminants / J. Al-Nu'airat [et al.] // The Chemical Record. — 2021. — Vol. 21, no. 2. — P. 315–342.
24. *Blazquez-Castro A.* Direct $^{1}O_2$ optical excitation: A tool for redox biology // Redox biology. — 2017. — Vol. 13. — P. 39–59.
25. *DeRosa M. C., Crutchley R. J.* Photosensitized singlet oxygen and its applications // Coordination Chemistry Reviews. — 2002. — Vol. 233. — P. 351–371.
26. *Maetzke A., Jensen S. J. K.* Reaction paths for production of singlet oxygen from hydrogen peroxide and hypochlorite // Chemical physics letters. — 2006. — Vol. 425, no. 1–3. — P. 40–43.
27. Taurine chloramine and hydrogen peroxide as a potential source of singlet oxygen for topical application / V. F. Ximenes [et al.] // Photochemistry and Photobiology. — 2021. — Vol. 97, no. 5. — P. 963–970.
28. *Shen H.-J., Hu Z.-N., Zhang C.* Singlet oxygen generation from a water-soluble hypervalent iodine (V) reagent AIBX and H_2O_2 : An access to artemisinin // The Journal of Organic Chemistry. — 2021. — Vol. 87, no. 6. — P. 3885–3894.
29. *Elsherbini M., Allemann R. K., Wirth T.* “Dark” singlet oxygen made easy // Chemistry—A European Journal. — 2019. — Vol. 25, no. 54. — P. 12486–12490.

30. Optical properties and photochemical production of hydroxyl radical and singlet oxygen after ozonation of dissolved organic matter / F. Leresche [et al.] // *Environmental Science: Water Research & Technology*. — 2021. — Vol. 7, no. 2. — P. 346–356.
31. Production rate and reactivity of singlet oxygen 1O_2 ($^1\Delta_g$) directly photoactivated at 1270 nm in lipid nanocapsules dispersed in water / A. Sivery [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2014. — Vol. 118, no. 5. — P. 2885–2893.
32. Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen / J. Krajczewski [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. — 2019. — Vol. 26. — P. 162–178.
33. Singlet oxygen 1O_2 in photocatalysis on TiO_2 . Where does it come from? / A. V. Demyanenko [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2019. — Vol. 123, no. 4. — P. 2175–2181.
34. Exploring BODIPY derivatives as singlet oxygen photosensitizers for PDT / R. Prieto-Montero [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. — 2020. — Vol. 96, no. 3. — P. 458–477.
35. Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy / D. L. Sai [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine*. — 2021. — Vol. 53, no. 4. — P. 495–504.
36. *Dmitrieva V. A., Tyutereva E. V., Voitsekhovskaja O. V.* Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles // *International journal of molecular sciences*. — 2020. — Vol. 21, no. 9. — P. 3237.
37. *Pathak V., Prasad A., Pospíšil P.* Formation of singlet oxygen by decomposition of protein hydroperoxide in photosystem II // *PLoS One*. — 2017. — Vol. 12, no. 7. — e0181732.
38. Singlet oxygen quantum yields in environmental waters / R. Ossola [et al.] // *Chemical Reviews*. — 2021. — Vol. 121, no. 7. — P. 4100–4146.
39. *Kanofsky J. R.* Measurement of singlet-oxygen in vivo: Progress and pitfalls // *Photochemistry and Photobiology*. — 2011. — Vol. 87, no. 1. — P. 14–17.

40. Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy / B. Li [et al.] // Journal of biophotonics. — 2016. — Vol. 9, no. 11/12. — P. 1314–1325.
41. Ratiometric Singlet Oxygen Sensor Based on BODIPY-DPA Dyad / A. A. Pakhomov [et al.] // Molecules. — 2022. — Vol. 27, no. 24. — P. 9060.
42. A Photodynamic Color Sensor Using Diacetylene Vesicles for the Rapid Visualization of Singlet Oxygen / F. Jannah [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2023. — P. 133336.
43. Singlet oxygen sensor green is not a suitable probe for 1O_2 in the presence of ionizing radiation / H. Liu [et al.] // Scientific Reports. — 2019. — Vol. 9, no. 1. — P. 8393.
44. UVA and endogenous photosensitizers—the detection of singlet oxygen by its luminescence / W. Bäumlér [et al.] // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2012. — Vol. 11, no. 1. — P. 107–117.
45. *Glazov A., Semenova I., Vasyutinskii O.* Steady-state fluorescence-phosphorescence studies of Radachlorin® kinetics and singlet oxygen formation in water // Journal of Applied and Laser Spectroscopy. — 2015. — Vol. 2, no. 1. — P. 9–14.
46. Photophysical properties and singlet oxygen generation efficiencies of water-soluble fullerene nanoparticles / A. S. Stasheuski [et al.] // Photochemistry and photobiology. — 2014. — Vol. 90, no. 5. — P. 997–1003.
47. Optical detection of singlet oxygen from single cells / J. W. Snyder [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2006. — Vol. 8, no. 37. — P. 4280–4293.
48. *Hatz S., Poulsen L., Ogilby P. R.* Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: Effects of oxygen diffusion and oxygen concentration // Photochemistry and photobiology. — 2008. — Vol. 84, no. 5. — P. 1284–1290.
49. *Le Behec M., Pigot T., Lacombe S.* Chemical quenching of singlet oxygen and other reactive oxygen species in water: a reliable method for the determination of quantum yields in photochemical processes? // ChemPhotoChem. — 2018. — Vol. 2, no. 7. — P. 622–631.

50. Rose Bengal photodynamic antimicrobial therapy for patients with progressive infectious keratitis: a pilot clinical study / A. Naranjo [et al.] // American journal of ophthalmology. — 2019. — Vol. 208. — P. 387–396.
51. Photochemical Tissue Bonding (PTB) methods for sutureless tissue adhesion / M. Ark [et al.] // International Journal of Adhesion and Adhesives. — 2016. — Vol. 71. — P. 87–98.
52. Efficacy of Rose Bengal and Curcumin mediated photodynamic therapy for the treatment of denture stomatitis in patients with habitual cigarette smoking: A randomized controlled clinical trial / N. Labban [et al.] // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. — 2021. — Vol. 35. — P. 102380.
53. *Ginimuge P. R., Jyothi S.* Methylene blue: revisited // Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology. — 2010. — Vol. 26, no. 4. — P. 517–520.
54. Harnessing the potential synergistic interplay between photosensitizer dark toxicity and chemotherapy / Y. Baglo [et al.] // Photochemistry and photobiology. — 2020. — Vol. 96, no. 3. — P. 636–645.
55. Enhancing selective photosensitizer accumulation and oxygen supply for high-efficacy photodynamic therapy toward glioma by 5-aminolevulinic acid loaded nanoplatfrom / X. Wang [et al.] // Journal of colloid and interface science. — 2020. — Vol. 565. — P. 483–493.
56. In vitro evaluation of methylene blue removal from root canal after Photodynamic Therapy / K. M. Ramalho [et al.] // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. — 2017. — Vol. 20. — P. 248–252.
57. *Read R. D.* Repurposing the drug verteporfin as anti-neoplastic therapy for glioblastoma // Neuro-oncology. — 2022. — Vol. 24, no. 5. — P. 708–710.
58. *Karges J.* Clinical development of metal complexes as photosensitizers for photodynamic therapy of cancer // Angewandte Chemie International Edition. — 2022. — Vol. 61, no. 5. — e202112236.

59. Immunogenic cell death in photodynamic-induced tumor cells based on photosens and photodithazine / V. Turubanova [et al.] // The 45th FEBS Congress, entitled 'Molecules of Life: Towards New Horizons'. Vol. 11. — 2021. — P. 408–409.
60. *Klimenko I., Lobanov A.* Spectral-Fluorescent Properties of Supramolecular Systems Based on Chlorin e 6 // Russian Journal of Physical Chemistry B. — 2018. — Vol. 12. — P. 10–16.
61. *Dilber G., Durmuş M., Kantekin H.* Non-aggregated zwitterionic Zinc (II) phthalocyanine complexes in water with high singlet oxygen quantum yield // Dyes and Pigments. — 2019. — Vol. 160. — P. 267–284.
62. *Foggiato A. A., Silva D. F., Castro R. C. F. R.* Effect of photodynamic therapy on surface decontamination in clinical orthodontic instruments // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. — 2018. — Vol. 24. — P. 123–128.
63. *Wiehe A., OBrien J. M., Senge M. O.* Trends and targets in antiviral phototherapy // Photochemical and Photobiological Sciences. — 2019. — Vol. 18. — P. 2565–2612.
64. Effective photodynamic inactivation of 26 Escherichia coli strains with different antibiotic susceptibility profiles: A planktonic and biofilm study / Ò. Gulas [et al.] // Antibiotics. — 2020. — Vol. 9, no. 3. — P. 98.
65. First Clinical Report of the Intraoperative Macro-and Micro-Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium for a Patient with Disseminated Lumbar Medulloblastoma / J. Akimoto [et al.] // Journal of Clinical Medicine. — 2023. — Vol. 12, no. 2. — P. 432.
66. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers / M. Scholz [et al.] // Photochemical & Photobiological Sciences. — 2013. — Vol. 12, no. 10. — P. 1873–1884.
67. Photosensitizer fluorescence and singlet oxygen luminescence as dosimetric predictors of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy induced clinical erythema / S. Mallidi [et al.] // Journal of biomedical optics. — 2014. — Vol. 19, no. 2. — P. 028001–028001.

68. Radachlorin-Containing Microparticles for Photodynamic Therapy / S. P. Krechetov [et al.] // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. — 2021. — Vol. 11, no. 3. — P. 458.
69. Binary Nanosystems Based on Amphiphilic Molecular Brushes Loaded with Radachlorine® Photosensitizer or Selenium Nanoparticles / S. Valueva [et al.] // *Technical Physics*. — 2020. — Vol. 65. — P. 1403–1410.
70. Optical and photophysical properties of the chlorin-type photosensitizer photolon in aqueous solutions of different acidities / I. Bagrov [et al.] // *Optics and Spectroscopy*. — 2017. — Vol. 123. — P. 392–398.
71. Fluorescence Anisotropy in Radachlorin and Chlorin e6 in Water–Methanol Solutions under One-and Two-Photon Excitation / I. A. Gorbunova [et al.] // *Photonics*. Vol. 10. — MDPI. 2022. — P. 9.
72. 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.
73. Efficient Synthesis of Chlorin e6 and Its Potential Photodynamic Immunotherapy in Mouse Melanoma by the Abscopal Effect / R. Shrestha [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — Vol. 24, no. 4. — P. 3901.
74. Photophysical properties of porphyrin photosensitizers / A. Dadeko [et al.] // *Optics and spectroscopy*. — 2015. — Vol. 119. — P. 633–637.
75. SMART FRAP: a robust and quantitative FRAP analysis method for phase separation / X. Wang [et al.] // *Chemical Communications*. — 2023. — Vol. 59, no. 16. — P. 2307–2310.
76. *Moud A. A.* Fluorescence recovery after photobleaching in colloidal science: introduction and application // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. — 2022. — Vol. 8, no. 3. — P. 1028–1048.
77. Photobleaching / A. Diaspro [et al.] // *Handbook of biological confocal microscopy*. — 2006. — P. 690–702.
78. Mechanistic study of bleach-imaged plasmon propagation (BIIPP) / D. Solis Jr [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2013. — Vol. 117, no. 16. — P. 4611–4617.

79. *Ganic D., Day D., Gu M.* Multi-level optical data storage in a photobleaching polymer using two-photon excitation under continuous wave illumination // *Optics and lasers in engineering*. — 2002. — Vol. 38, no. 6. — P. 433–437.
80. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6–polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer–polymer interaction in vitro / H. Isakau [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2008. — Vol. 92, no. 3. — P. 165–174.
81. *Mondal P. P.* Minimizing photobleaching in fluorescence microscopy by depleting triplet states // *Applied Physics Letters*. — 2008. — Vol. 92, no. 1. — P. 013902.
82. *Demchenko A. P.* Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection // *Methods and applications in fluorescence*. — 2020. — Vol. 8, no. 2. — P. 022001.
83. *Lill Y., Hecht B.* Single dye molecules in an oxygen-depleted environment as photostable organic triggered single-photon sources // *Applied physics letters*. — 2004. — Vol. 84, no. 10. — P. 1665–1667.
84. One-and two-photon photochemical stability of linear and branched fluorene derivatives / C. C. Corredor [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 2006. — Vol. 184, no. 1/2. — P. 105–112.
85. Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy / J. Widengren [et al.] // *The journal of physical chemistry A*. — 2007. — Vol. 111, no. 3. — P. 429–440.
86. Photochemical Bleaching of an Elaborate Artificial Light-Harvesting Antenna / M. A. Alamiry [et al.] // *ChemPhysChem*. — 2015. — Vol. 16, no. 9. — P. 1867–1872.
87. Effects of temperature and concentration on the rate of photobleaching of Erythrosine in water / J. K. Karlsson [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry A*. — 2017. — Vol. 121, no. 45. — P. 8569–8576.

88. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: evidence of two-step photolysis / C. Eggeling [et al.] // *Analytical chemistry*. — 1998. — Vol. 70, no. 13. — P. 2651–2659.
89. *Talhavini M., Atvars T.* Photostability of xanthene molecules trapped in poly (vinyl alcohol)(PVA) matrices // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 1999. — Vol. 120, no. 2. — P. 141–149.
90. *Spikes J. D., Bommer J. C.* Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors // *Photochemistry and photobiology*. — 1993. — Vol. 58, no. 3. — P. 346–350.
91. *Zhang Y., Görner H.* Photoprocesses of chlorin e6 bound to lysozyme or bovin serum albumin // *Dyes and Pigments*. — 2009. — Vol. 83, no. 2. — P. 174–179.
92. Photostability studies of three new bicyclo-boron dipyrromethene difluoride dyes / W. N. Sisk [et al.] // *Dyes and pigments*. — 2002. — Vol. 55, no. 2/3. — P. 143–150.
93. Improvement in photostability of solid state dye by oxygen removal / J. Krause [et al.] // *Optical Materials Express*. — 2012. — Vol. 2, no. 1. — P. 71–77.
94. *Hongying Y., Fuyuan W., Zhiyi Z.* Photobleaching of chlorins in homogeneous and heterogeneous media // *Dyes and Pigments*. — 1999. — Vol. 43, no. 2. — P. 109–117.
95. Оптические и фотофизические свойства фотосенсибилизатора хлориновой природы Фотолона в водных растворах разной кислотности / И. Багров [и др.] // *Оптика и спектроскопия*. — 2017. — т. 123, № 3. — с. 364–371.
96. Фотостабильность растворов димегина, фотодитазина и радахлорина / И. Багров [и др.] // *Оптика и спектроскопия*. — 2019. — т. 126, № 2. — с. 170–176.
97. Фотофизические свойства фотосенсибилизаторов порфириновой природы / А. Дадеко [и др.] // *Оптика и спектроскопия*. — 2015. — т. 119, № 4. — с. 617–622.

98. Сравнительные исследования фотофизических свойств димегина, фотодитазина и радахлорина / И. Багров [и др.] // Оптика и спектроскопия. — 2019. — т. 126, № 2. — с. 162—169.
99. Kinetics of photobleaching of Radachlorin® photosensitizer in aqueous solutions / D. Beltukova [et al.] // Chemical Physics Letters. — 2016. — Vol. 662. — P. 127–131.
100. *Vyšniauskas A., Kuimova M. K.* A twisted tale: measuring viscosity and temperature of microenvironments using molecular rotors // International Reviews in Physical Chemistry. — 2018. — Vol. 37, no. 2. — P. 259–285.
101. *Wallrabe H., Periasamy A.* Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy // Current opinion in biotechnology. — 2005. — Vol. 16, no. 1. — P. 19–27.
102. FRET microscopy: basics, issues and advantages of FLIM-FRET imaging / A. Periasamy [et al.] // Advanced time-correlated single photon counting applications. — 2015. — P. 249–276.
103. *König K.* Clinical multiphoton tomography // Journal of biophotonics. — 2008. — Vol. 1, no. 1. — P. 13–23.
104. *Chang C.-W., Sud D., Mycek M.-A.* Fluorescence lifetime imaging microscopy // Methods in cell biology. — 2007. — Vol. 81. — P. 495–524.
105. Sensing temperature in vitro and in cells using a BODIPY molecular probe / M. M. Ogle [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. — 2019. — Vol. 123, no. 34. — P. 7282–7289.
106. Fluorescence lifetime-based pH sensing by platinum nanoclusters / L. Jin [et al.] // Analyst. — 2019. — Vol. 144, no. 11. — P. 3533–3538.
107. *Karpovich D., Blanchard G.* Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale // The Journal of physical chemistry. — 1995. — Vol. 99, no. 12. — P. 3951–3958.
108. *So P. T., French T. E., Gratton E.* Frequency domain time-resolved microscope using a fast-scan CCD camera // Time-Resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry IV. Vol. 2137. — SPIE. 1994. — P. 83–92.

109. Time-resolved fluorescence in photodynamic therapy / S.-C. A. Yeh [et al.] // Photonics. Vol. 1. — MDPI. 2014. — P. 530–564.
110. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors / P. V. Butte [et al.] // Neuroimage. — 2011. — Vol. 54. — S125–S135.
111. Toward the clinical application of time-domain fluorescence lifetime imaging / I. Munro [et al.] // Journal of Biomedical Optics. — 2005. — Vol. 10, no. 5. — P. 051403–051403.
112. *Torrado B., Malacrida L., Ranjit S.* Linear combination properties of the phasor space in fluorescence imaging // Sensors. — 2022. — Vol. 22, no. 3. — P. 999.
113. *Sun Y., Liao S.-C.* The Ultimate Phasor Plot and beyond // ISS Inc. — 2014.
114. Automatic segmentation of intravital fluorescence microscopy images by K-means clustering of FLIM phasors / Y. Zhang [et al.] // Optics Letters. — 2019. — Vol. 44, no. 16. — P. 3928–3931.
115. *Vallmitjana A., Torrado B., Gratton E.* Phasor-based image segmentation: machine learning clustering techniques // Biomedical optics express. — 2021. — Vol. 12, no. 6. — P. 3410–3422.
116. Comprehensive Investigation of Parameters Influencing Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy in Frequency-and Time-Domain Illustrated by Phasor Plot Analysis / T. Kellerer [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Vol. 23, no. 24. — P. 15885.
117. Analysis of In Vivo Radachlorin Accumulation through FLIM-Assisted Examination of Ex Vivo Histological Samples / A. V. Belashov [et al.] // Photonics. Vol. 9. — MDPI. 2022. — P. 711.
118. *González Flecha F. L., Levi V.* Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy // Biochemistry and molecular biology education. — 2003. — Vol. 31, no. 5. — P. 319–322.
119. High-resolution intracellular viscosity measurement using time-dependent fluorescence anisotropy / W. C. Parker [et al.] // Optics express. — 2010. — Vol. 18, no. 16. — P. 16607–16617.
120. *Lakwicz J.* Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2006.

121. *Albrecht C.* Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy. — 2008.
122. Probing Viscosity of Co-Polymer Hydrogel and HeLa Cell Using Fluorescent Gold Nanoclusters: Fluorescence Correlation Spectroscopy and Anisotropy Decay / S. Chakraborty [et al.] // *ChemPhysChem*. — 2020. — Vol. 21, no. 5. — P. 406–414.
123. Two-photon excited fluorescence dynamics in enzyme-bound NADH: The heterogeneity of fluorescence decay times and anisotropic relaxation / I. A. Gorbunova [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2021. — Vol. 125, no. 34. — P. 9692–9707.
124. *König K., Wabnitz H., Dietel W.* Variation in the fluorescence decay properties of haematoporphyrin derivative during its conversion to photoproducts // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 1990. — Vol. 8, no. 1. — P. 103–111.
125. *Cubeddu R., Ramponi R., Bottioli G.* Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin derivative in micelles // *Chemical physics letters*. — 1986. — Vol. 128, no. 4. — P. 439–442.
126. Time-resolved fluorescence imaging of photosensitizer distributions in mammalian cells using a picosecond laser line-scanning microscope / J. P. Connelly [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 2001. — Vol. 142, no. 2/3. — P. 169–175.
127. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT / E. Zenkevich [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 1996. — Vol. 33, no. 2. — P. 171–180.
128. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells / S. Sasnouski [et al.] // *Radiation research*. — 2007. — Vol. 168, no. 2. — P. 209–217.
129. SLIM: a new method for molecular imaging / A. Rück [et al.] // *Microscopy research and technique*. — 2007. — Vol. 70, no. 5. — P. 485–492.

130. Surfactant induced aggregation–disaggregation of photodynamic active chlorin e6 and its relevant interaction with DNA alkylating quinone in a biomimic micellar microenvironment / M. Jadhao [et al.] // RSC advances. — 2015. — Vol. 5, no. 99. — P. 81449–81460.
131. *Cacace T., Bianco V., Ferraro P.* Quantitative phase imaging trends in biomedical applications // Optics and Lasers in Engineering. — 2020. — Vol. 135. — P. 106188.
132. Quantitative phase imaging / M. Mir [et al.] // Progress in optics. — 2012. — Vol. 57, no. 133–37. — P. 217.
133. Quantitative assessment of cancer cell morphology and motility using telecentric digital holographic microscopy and machine learning / V. K. Lam [et al.] // Cytometry Part A. — 2018. — Vol. 93, no. 3. — P. 334–345.
134. Digital holographic microscopy in label-free analysis of cultured cells' response to photodynamic treatment / A. Belashov [et al.] // Optics letters. — 2016. — Vol. 41, no. 21. — P. 5035–5038.
135. Quantitative assessment of changes in cellular morphology at photodynamic treatment in vitro by means of digital holographic microscopy / A. Belashov [et al.] // Biomedical optics express. — 2019. — Vol. 10, no. 10. — P. 4975–4986.
136. *Langehanenberg P., Bally G. v., Kemper B.* Application of partially coherent light in live cell imaging with digital holographic microscopy // Journal of Modern Optics. — 2010. — Vol. 57, no. 9. — P. 709–717.
137. Profilometry and reflectometry using low-coherent digital holography / T. Nomura [et al.] // Biomedical Optics. — Optica Publishing Group. 2010. — JMA25.
138. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy / F. Charrière [et al.] // Optics letters. — 2006. — Vol. 31, no. 2. — P. 178–180.
139. *Kreis T.* Digital holographic interference-phase measurement using the Fourier-transform method // JOSA A. — 1986. — Vol. 3, no. 6. — P. 847–855.

140. Off-axis digital holographic microscopy: practical design parameters for operating at diffraction limit / E. Sánchez-Ortiga [et al.] // *Applied optics*. — 2014. — Vol. 53, no. 10. — P. 2058–2066.
141. *Liebling M., Blu T., Unser M.* Complex-wave retrieval from a single off-axis hologram // *JOSA A*. — 2004. — Vol. 21, no. 3. — P. 367–377.
142. *Yamaguchi I.* Phase-Shifting Digital Holography: Principles and applications // *Digital holography and three-dimensional display: principles and applications*. — 2006. — P. 145–171.
143. *Gao P., Yuan C.* Resolution enhancement of digital holographic microscopy via synthetic aperture: a review // *Light: Advanced Manufacturing*. — 2022. — Vol. 3, no. 1. — P. 105–120.
144. Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy / B. Rappaz [et al.] // *Journal of biomedical optics*. — 2009. — Vol. 14, no. 3. — P. 034049–034049.
145. *Barer R.* Interference microscopy and mass determination // *Nature*. — 1952. — Vol. 169, no. 4296. — P. 366–367.
146. Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging / H. Park [et al.] // *Scientific reports*. — 2016. — Vol. 6, no. 1. — P. 34257.
147. *Girshovitz P., Shaked N. T.* Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization // *Biomedical optics express*. — 2012. — Vol. 3, no. 8. — P. 1757–1773.
148. Real time blood testing using quantitative phase imaging / H. V. Pham [et al.] // *PloS one*. — 2013. — Vol. 8, no. 2. — e55676.
149. Measurements of morphological and biophysical alterations in individual neuron cells associated with early neurotoxic effects in Parkinson's disease / S.-A. Yang [et al.] // *Cytometry part A*. — 2017. — Vol. 91, no. 5. — P. 510–518.

150. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy / P. Marquet [et al.] // *Optics letters*. — 2005. — Vol. 30, no. 5. — P. 468–470.
151. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy / B. Kemper [et al.] // *Journal of biomedical optics*. — 2006. — Vol. 11, no. 3. — P. 034005–034005.
152. Quantitative phase imaging using digital holographic microscopy reliably assesses morphology and reflects elastic properties of fibrotic intestinal tissue / A. Bokemeyer [et al.] // *Scientific reports*. — 2019. — Vol. 9, no. 1. — P. 19388.
153. *El-Schich Z., Leida Mölder A., Gjörlöff Wingren A.* Quantitative phase imaging for label-free analysis of cancer cells—focus on digital holographic microscopy // *Applied Sciences*. — 2018. — Vol. 8, no. 7. — P. 1027.
154. Drug resistance detection of endometrial cancer cell lines using digital holographic microscopy / R. Cao [et al.] // *Quantitative Phase Imaging V*. Vol. 10887. — SPIE. 2019. — P. 188–192.
155. Evaluation of the metastatic potential of malignant cells by image processing of digital holographic microscopy data / V. L. Calin [et al.] // *FEBS open Bio*. — 2017. — Vol. 7, no. 10. — P. 1527–1538.
156. Biodynamic digital holography of chemoresistance in a pre-clinical trial of canine B-cell lymphoma / H. Choi [et al.] // *Biomedical optics express*. — 2018. — Vol. 9, no. 5. — P. 2214–2228.
157. Changes in optical properties of electroporated cells as revealed by digital holographic microscopy / V. L. Calin [et al.] // *Biomedical Optics Express*. — 2017. — Vol. 8, no. 4. — P. 2222–2234.
158. Coherence-controlled holographic microscopy enabled recognition of necrosis as the mechanism of cancer cells death after exposure to cytopathic turbid emulsion / J. Collakova [et al.] // *Journal of biomedical optics*. — 2015. — Vol. 20, no. 11. — P. 111213–111213.

159. Quantitative phase imaging of cells in a flow cytometry arrangement utilizing Michelson interferometer-based off-axis digital holographic microscopy / J. Min [et al.] // *Journal of biophotonics*. — 2019. — Vol. 12, no. 9. — e201900085.
160. 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.
161. Fast autofocusing in digital holography using the magnitude differential / M. Lyu [et al.] // *Applied Optics*. — 2017. — Vol. 56, no. 13. — F152–F157.
162. Extended depth-of-field in holographic imaging using deep-learning-based autofocusing and phase recovery / Y. Wu [et al.] // *Optica*. — 2018. — Vol. 5, no. 6. — P. 704–710.
163. *Pitkäaho T., Manninen A., Naughton T. J.* Performance of autofocus capability of deep convolutional neural networks in digital holographic microscopy // *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*. — Optica Publishing Group. 2017. — W2A–5.
164. Automatic phase aberration compensation for digital holographic microscopy based on deep learning background detection / T. Nguyen [et al.] // *Optics express*. — 2017. — Vol. 25, no. 13. — P. 15043–15057.
165. Stitching sub-aperture in digital holography based on machine learning / F. Pan [et al.] // *Optics Express*. — 2020. — Vol. 28, no. 5. — P. 6537–6551.
166. *Yi F., Moon I., Javidi B.* Automated red blood cells extraction from holographic images using fully convolutional neural networks // *Biomedical optics express*. — 2017. — Vol. 8, no. 10. — P. 4466–4479.
167. Machine learning for sperm selection / J. B. You [et al.] // *Nature Reviews Urology*. — 2021. — Vol. 18, no. 7. — P. 387–403.
168. Partially spatially coherent digital holographic microscopy and machine learning for quantitative analysis of human spermatozoa under oxidative stress condition / V. Dubey [et al.] // *Scientific reports*. — 2019. — Vol. 9, no. 1. — P. 3564.

169. Machine learning-based in-line holographic sensing of unstained malaria-infected red blood cells / T. Go [et al.] // *Journal of biophotonics*. — 2018. — Vol. 11, no. 9. — e201800101.
170. *Yi F., Moon I., Javidi B.* Cell morphology-based classification of red blood cells using holographic imaging informatics // *Biomedical optics express*. — 2016. — Vol. 7, no. 6. — P. 2385–2399.
171. Automated classification of cell morphology by coherence-controlled holographic microscopy / L. Strbkova [et al.] // *Journal of biomedical optics*. — 2017. — Vol. 22, no. 8. — P. 086008–086008.
172. Safety and delivery efficiency of a photodynamic treatment of the lungs using indocyanine green and extracorporeal near infrared illumination / G. Kassab [et al.] // *Journal of biophotonics*. — 2020. — Vol. 13, no. 10. — e202000176.
173. Nebulization as a tool for photosensitizer delivery to the respiratory tract / G. Kassab [et al.] // *Journal of Biophotonics*. — 2019. — Vol. 12, no. 4. — e201800189.
174. *Mallidi S., Spring B. Q., Hasan T.* Optical imaging, photodynamic therapy and optically-triggered combination treatments // *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* — 2015. — Vol. 21, no. 3. — P. 194.
175. *Douplik A.* Combined surgery and photodynamic therapy of cancer // *Physics Procedia*. — 2010. — Vol. 5. — P. 641–645.
176. Red-diode laser photodynamic therapy of basal cell cancer using photosensitizer radachlorin: Preliminary results / O. A. Marcano [et al.] // *Optics InfoBase Conference Papers*. — 2005.
177. *Krasnovsky A., Benditkis A., Kozlov A.* Kinetic measurements of singlet oxygen phosphorescence in hydrogen-free solvents by time-resolved photon counting // *Biochemistry (Moscow)*. — 2019. — Vol. 84. — P. 153–163.
178. Visible to near IR luminescence spectrum of Radachlorin under excitation at 405 nm / V. Belik [et al.] // *Chemical Physics Letters*. — 2016. — Vol. 665. — P. 127–130.

179. Analysis of Radachlorin localization in living cells by fluorescence lifetime imaging microscopy / A. Belashov [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2023. — Vol. 243. — P. 112699.
180. Time-resolved spectral analysis of Radachlorin luminescence in water / V. Belik [et al.] // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. — 2017. — Vol. 178. — P. 181–184.
181. Photostability of different chlorine photosensitizers / J. Ferreira [et al.] // Laser Physics Letters. — 2008. — Vol. 5, no. 2. — P. 156–161.
182. Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions / M. Bregnhøj [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2016. — Vol. 18, no. 33. — P. 22946–22961.
183. Effect of oxygen concentration on singlet oxygen luminescence detection / L. Chen [et al.] // Journal of Luminescence. — 2014. — Vol. 152. — P. 98–102.
184. *Schweitzer C., Schmidt R.* Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen // Chem. Rev. — 2003. — Vol. 103. — P. 1685.
185. Singlet oxygen quenching by oxygen in tetraphenyl-porphyrin solutions / R. Dedic [et al.] // J. Luminesc. — 2006. — Vol. 119/120. — P. 209–213.
186. Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions / M. Bregnhøj [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2016. — Vol. 18. — P. 22946–22961.
187. Time-resolved spectral analysis of Radachlorin luminescence in water / V. P. Belik [et al.] // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. — 2017. — Vol. 178. — P. 181–184.
188. *Georgakoudi I., Nichols M. G., Foster T. H.* The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry // Photochemistry and photobiology. — 1997. — Vol. 65, no. 1. — P. 135–144.
189. Monitoring photosensitizer uptake using two photon fluorescence lifetime imaging microscopy / S.-C. A. Yeh [et al.] // Theranostics. — 2012. — Vol. 2, no. 9. — P. 817.

190. Characterization of fluorescence lifetime of photofrin and delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in living cells using single- and two-photon excitation / J. A. Russell [et al.] // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 2008. — Vol. 14, no. 1. — P. 158–166.
191. Fluorescence imaging of Foscan® and Foslip in the plasma membrane and in whole cells / H.-P. Lassalle [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2008. — Vol. 92, no. 1. — P. 47–53.
192. A non-covalent complex of quantum dots and chlorin e 6: Efficient energy transfer and remarkable stability in living cells revealed by FLIM / J. Valanciunaite [et al.] // *RSC Advances*. — 2014. — Vol. 4, no. 94. — P. 52270–52278.
193. Subcellular localization and photodynamic activity of Photodithazine (glucosamine salt of chlorin e6) in murine melanoma B16-F10: an in vitro and in vivo study / B. A. Ono [et al.] // *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVII*. Vol. 10476. — SPIE. 2018. — P. 138–147.
194. *Mirbagheri M., Mohebbi-Kalhari D., Jirofti N.* Evaluation of mechanical properties and medical applications of polycaprolactone small diameter artificial blood vessels // *International Journal of Basic Science in Medicine*. — 2017. — Vol. 2, no. 1. — P. 58–70.
195. The Effect of pH and Surfactant on the Aggregation Behavior of Chlorin p6: A Fluorescence Spectroscopic Study / A. Datta [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. — 2002. — Vol. 75, no. 5. — P. 488–494.
196. Two-photon excited fluorescence dynamics in NADH in water–methanol solutions: The role of conformation states / I. A. Gorbunova [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2020. — Vol. 124, no. 47. — P. 10682–10697.
197. *Cunderlikova B., Gangeskar L., Moan J.* Acid–base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 1999. — Vol. 53. — P. 81–90.

198. *Reichardt C.* Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators // Chemical Review. — 1994. — Vol. 94. — P. 2319–2358.
199. Effect of solvent dielectric properties on the spontaneous-emission rate constant of molecular singlet oxygen / E. Jarnikova [et al.] // Journal of Applied Spectroscopy. — 2017. — Vol. 83. — P. 903–908.
200. Anisotropic relaxation in NADH excited states studied by polarization-modulation pump–probe transient spectroscopy / I. A. Gorbunova [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2020. — Vol. 22, no. 32. — P. 18155–18168.
201. *Lakowicz J. R., Lakowicz J. R.* Introduction to fluorescence // Principles of fluorescence spectroscopy. — 1999. — P. 1–23.
202. *Callis P. R.* On the theory of two-photon induced fluorescence anisotropy with application to indoles // The Journal of chemical physics. — 1993. — Vol. 99, no. 1. — P. 27–37.
203. Fluorescence anisotropy in indole under two-photon excitation in the spectral range 385–510 nm / M. Sasin [et al.] // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2018. — Vol. 20, no. 30. — P. 19922–19931.
204. Picosecond photoisomerization and rotational reorientation dynamics in solution / M. Lee [et al.] // The Journal of chemical physics. — 1986. — Vol. 85, no. 8. — P. 4341–4347.
205. *Becker W.* The bh TCSPC handbook. — Becker & Hickl GmbH, 2021.
206. Simultaneous detection of local polarizability and viscosity by a single fluorescent probe in cells / G. Abbandonato [et al.] // Biophysical Journal. — 2018. — Vol. 114, no. 9. — P. 2212–2220.
207. *Ghosh C., Nandi S., Bhattacharyya K.* Probing micro-environment of lipid droplets in a live breast cell: MCF7 and MCF10A // Chemical Physics Letters. — 2017. — Vol. 670. — P. 27–31.
208. A NBD-based simple but effective fluorescent pH probe for imaging of lysosomes in living cells / X.-J. Cao [et al.] // Analytica Chimica Acta. — 2016. — Vol. 920. — P. 86–93.

209. *Blatter L. A.* Cell volume measurements by fluorescence confocal microscopy: Theoretical and practical aspects // *Methods in enzymology*. Vol. 307. — Elsevier, 1999. — P. 274–295.
210. *Verrier N., Atlan M.* Off-axis digital hologram reconstruction: some practical considerations // *Applied optics*. — 2011. — Vol. 50, no. 34. — H136–H146.
211. *Шевкунов И. А.* Метод фазовой развёртки сдвигом восстановленного поля // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Физика. Химия*. — 2015. — т. 2, № 4. — с. 395–401.
212. Разработка алгоритмов сегментации в голографической микроскопии и томографии для определения морфологических параметров клеток / А. В. Белашов [и др.] // *Письма в Журнал технической физики*. — 2019. — т. 45, № 22. — с. 24–27.
213. *Freshney R. I.* Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. — John Wiley & Sons, 2015.
214. *Field A., Miles J., Field Z.* Discovering Statistics Using R. — SAGE, 2012.
215. *Zhao S.-R., Halling H.* A new Fourier method for fan beam reconstruction // 1995 IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference Record. Vol. 2. — IEEE. 1995. — P. 1287–1291.
216. High-accuracy identification of micro-plastics by holographic microscopy enabled support vector machine / V. Bianco [et al.] // *Quantitative Phase Imaging V*. Vol. 10887. — International Society for Optics, Photonics. 2019. — 108870F.
217. Barium titanate nanoparticles and hypergravity stimulation improve differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts / A. Rocca [et al.] // *International journal of nanomedicine*. — 2015. — Vol. 10. — P. 433.
218. The biological properties of OGI surfaces positively act on osteogenic and angiogenic commitment of mesenchymal stem cells / P. Ghensi [et al.] // *Materials*. — 2017. — Vol. 10, no. 11. — P. 1321.

219. 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.
220. In vitro monitoring of photoinduced necrosis in HeLa cells using digital holographic microscopy and machine learning / A. Belashov [et al.] // JOSA A. — 2020. — Vol. 37, no. 2. — P. 346–352.

Список сокращений и условных обозначений

СК - Синглетный кислород

ФС - Фотосенсибилизатор

ФДТ - Фотодинамическая терапия

ФДВ - Фотодинамическое воздействие

ФО - Фотообесцвечивание

ТРЕ - Двухфотонное возбуждение

ОРЕ - Однофотонное возбуждение