

На правах рукописи

ИШЕМГУЛОВ Азамат Талгатович

**ДЛИТЕЛЬНАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МОЛЕКУЛ
СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ТКАНЯХ
ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ**

Специальность: 01.04.05 – оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Центре коллективного пользования приборным оборудованием «Институт микро- и нанотехнологий» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет»

Научный руководитель

Летута Сергей Николаевич,
доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты

Пашенко Владимир Захарович,
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий сектором фотобиологии и
биофотоники Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова

Тучин Валерий Викторович,
доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий лабораторией лазерной диагностики
технических и живых систем Института проблем
точной механики и управления РАН

Чикишев Андрей Юрьевич,
доктор физико-математических наук, доцент,
профессор Международного учебно-научного
лазерного центра Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в __ ч. __ мин. на заседании диссертационного совета МГУ.01.08 на физическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, физическая аудитория имени Р.В. Хохлова

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/152212235/>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.01.08
доктор физико-математических наук
kosareva@physics.msu.ru

О.Г. Косарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Для повышения точности прогноза при оптической диагностике и эффективности ФДТ требуется оперативный контроль содержания кислорода в ткани. Перспективным для решения такой задачи выглядит использование именно длительной люминесценции ФС. Возбуждённые молекулы в триплетном состоянии в тканях служат одновременно и сенсибилизаторами СК, и люминесцирующими центрами, несущими «диагностическую» информацию. ФС являются индикаторами состояния тканей, поскольку при развитии патологии механизмы накопления и расхода кислорода в них могут существенно меняться. Последнее крайне важно для ранней диагностики патологий, так как первичные биохимические изменения в тканях трудно распознать с использованием традиционных (нелюминесцентных) способов.

Релаксация возбужденных триплетных состояний ФС в тканях может быть излучательной или безызлучательной. В присутствии кислорода в среде основной канал релаксации ФС – безызлучательный и свечение с участием триплетных возбуждений заметно подавляется. Тушение флуоресценции зондов нашло практическое применение для оценки количества образующегося

СК в системе. Подобный подход часто применяют для неживых систем. Однако в биологических средах длительное послесвечение ФС сильно зависит от состояния окружения, без учета которого простое перенесение результатов модельных экспериментов на живые системы некорректно.

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

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

Подвижные молекулы ФС в триплетном состоянии и СК также могут аннигилировать. В результате синглет-триплетной аннигиляции (СТА) кислород возвращается в основное невозбужденное триплетное состояние, а ФС переходит в первое возбужденное синглетное состояние. Возникающая при этом аннигиляционная ЗФ (АЗФ) одновременно несет информацию и о свойствах ФС, и о свойствах СК. Вероятность перехода ФС в синглетное состояние при СТА существенно выше, чем при ТТА, поэтому интенсивность АЗФ ФС в тканях существенно выше интенсивности их собственной ЗФ или фосфоресценции СК. Эти преимущества обеспечивают АЗФ широкие перспективы для использования при неинвазивном мониторинге состояния тканей и дозиметрии в режиме реального времени.

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

Цель работы. Цель настоящей работы – определение эффективности конкурирующих каналов релаксации триплетных состояний молекул фотосенсибилизаторов в тканях здоровых и сарком-больных животных и

разработка на этой основе оптического метода мониторинга содержания кислорода в тканях.

Задачи работы. Для достижения цели поставлены следующие задачи.

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту.

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

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

3. При импульсно-периодическом возбуждении фотосенсибилизаторов серией лазерных импульсов наносекундной длительности в живых тканях при

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

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

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

Научная новизна работы.

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

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

3. Показано, что эффект тушения АЗФ наблюдается преимущественно в тканях со злокачественной патологией и почти не проявляется в здоровых тканях. На этом основании предложен способ оптической диагностики злокачественных новообразований.

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

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

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

Научно-практическая значимость.

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

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

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

4. Возможность отслеживания динамики изменения содержания подвижного кислорода в тканях является важным приложением в ФДТ для мониторинга количества образуемого и поглощаемого тканью СК, т.е. оперативного контроля «эффективной дозы» облучения при ФДТ.

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

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

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

Апробация работы. Изложенные в диссертации результаты и выводы докладывались, обсуждались и дискутировались в рамках различных конференций (симпозиумов), в том числе: Russian-Japanese Conference “Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials” (OSU, Orenburg, 2014; НУ, Hiroshima, 2016); V Съезд биофизиков России (ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2015); Международная конференция молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика ’15» (ИТЭБ РАН, Пущино, 2015); Международная молодёжная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий» (МИФИ, Москва, 2016-2018); Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (СГУ, Севастополь, 2016-2017); 4-th International Symposium “Molecular Photonics” dedicated to academician A.N. Terenin (St. Petersburg, 2016); International symposium “Fundamentals of Laser Assisted Micro- and Nanotechnologies” (ИТМО, Санкт-Петербург, 2016); 2nd International Symposium on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine” (Moscow, 2017); Симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2016-2018); VI Symposium on Optics & Biophotonics “Saratov Fall Meeting” (SGU, Saratov, 2018).

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 25 работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени

М.В. Ломоносова, и 1 статье из списка ВАК РФ. Список публикаций приведён в конце автореферата.

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

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка использованной литературы, включающего 158 ссылок. Работа содержит 149 страниц печатного текста, 36 рисунков, 7 таблиц.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, отражена новизна и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования, определены защищаемые положения.

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

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

Основные эксперименты проводились с использованием оригинальной автоматизированной установки стационарной и динамической флуориметрии. Регистрировались как стационарные (при непрерывном возбуждении) спектры поглощения, эмиссии и возбуждения люминесценции, так и динамические параметры послесвечения молекул при импульсном возбуждении. Наличие патологий в тканях выявлялось по результатами гистологических исследований.

Основным материалом исследования служили ткани молочной железы, лёгкого, печени и почек лабораторных мышей (*Mus musculus*), как чистых линий BYRB и BALB, так и свободно скрещивающихся особей. Часть

материала была получена при подкожной пересадке опухолей молочной железы в холку здоровым самцам той же линии. Описанные спонтанные опухоли молочных желез мышей данной линии во многом соответствуют аналогичному раковому заболеванию человека по гистологической и клинической картине.

В качестве ФС использовались ксантеновые красители – галогензамещенные флуоресцеина – эритрозин, эозин, бенгальский розовый. Их преимущества для использования в качестве ФС: хорошая растворимость в воде, способность проникать внутрь клеток, высокий квантовый выход в триплетное состояние, удобные для регистрации полосы поглощения и эмиссии, низкая токсичность. При исследованиях *in vitro*, после окрашивания образцы помещались в герметичную термостатируемую камеру. К камере при необходимости подключался баллон с газообразным азотом для регулирования концентрации кислорода в атмосфере над образцами.

Молекулы красителей возбуждались излучением второй гармоники ($\lambda_{\text{возб}} = 532$ нм) твердотельного YAG:Nd³⁺ лазера. Параметры возбуждающих импульсов: плотность мощности $P < 1$ МВт/см², длительность импульса 15 нс, частота следования импульсов регулировалась от 0 до 10 Гц. Кинетика длительной люминесценции регистрировалась через монохроматор МДР-41 с помощью фотоумножителя ФЭУ-84 с управляющим электродом для регулировки чувствительности приёмника. Все измерения производились при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении.

Третья глава диссертации посвящена выявлению особенностей затухания ЗФ различных типов и ФФ экзогенных ФС в живых тканях *in vitro*. Исследовано послесвечение ФС в обычных условиях и при деоксигенации окрашенных тканей путем их инкубации в проточном газообразном азоте. Показано, что при нормальных условиях ЗФ ксантеновых ФС в тканях формируется как суперпозиция термоактивированной ЗФ и АЗФ. Процесс СТА вносит определяющий вклад в регистрируемый сигнал ЗФ на ранней стадии кинетики (0 - 10 мкс после возбуждения). В интервале времени 0-10 мкс кинетическая кривая ЗФ немонотонна, содержит участки нарастания и спада. При деоксигенации образцов происходит тушение ЗФ на участке кинетической кривой 0 – 10 мкс. Этот процесс обратимый. Изменения кинетики ЗФ эритрозина в ткани молочной железы мыши при различных временах инкубации образца в проточном газообразном азоте показаны на рис. 1.

На «поздней» кинетике (десятки и сотни микросекунд после возбуждения) доминирует термостимулированная ЗФ, выход которой при уменьшении концентрации кислорода, наоборот, увеличивается. При этом скорости затухания ТЗФ и ФФ уменьшаются практически синхронно (рис. 2).

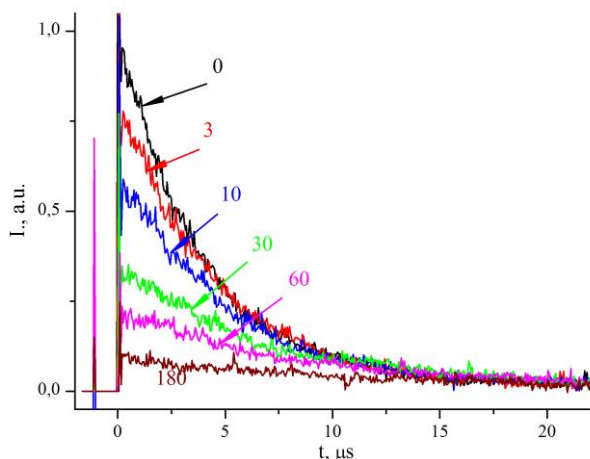


Рисунок 1 – Кинетика затухания ЗФ эритрозина в молочной железе мыши при инкубации образца в проточном молекулярном азоте. Цифрами указана продолжительность инкубации в секундах

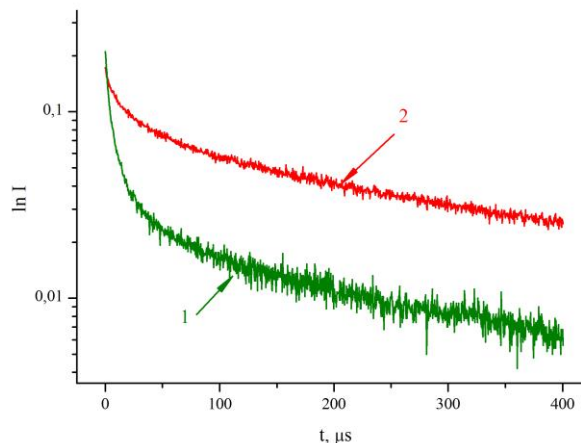


Рисунок 2 – Кинетика затухания ЗФ (1) и фосфоресценции (2) эозина в ткани молочной железы мыши

В целом интенсивность длительного послесвечения молекул в тканях в течение первых 20 мкс уменьшается примерно на 90 %, однако свечение не исчезает вплоть до 600 мкс после возбуждения. Это означает, что некоторое количество триплетных возбуждений в тканях сохраняется, но их релаксация происходит уже независимо друг от друга. В этом временном диапазоне кинетические кривые ЗФ и ФФ монотонные и близки к экспоненциальным.

Заметим, что в окрашенных тканях *in vitro* не обнаружено проявлений взаимной триплет-триплетной аннигиляции молекул красителей, которая могла бы также вносить вклад в ЗФ. Возможно, это связано с ограниченной подвижностью ФС, находящихся в тканях. Таким образом, при отсутствии кислорода наблюдается преимущественно ТЗФ молекул.

Скорость реакций СТА значительно превышает скорости излучательной релаксации триплет-возбужденных молекул ФС за счёт эффективной миграции молекулярного кислорода. Разница в скоростях затухания, позволяет разрешить во времени спектрально совпадающие основные компоненты сигнала ЗФ (АЗФ и ТЗФ). Для исследованных нами красителей интегральную интенсивность АЗФ следует измерять на участке 1–10 мкс после возбуждения. ТЗФ

целесообразно измерять на участке 20 - 60 мкс. В этом диапазоне вклад СТА уже пренебрежимо мал, а соотношение сигнал/шум для ЗФ еще достаточно удовлетворительное.

Интенсивность АЗФ параметрически зависит от начальной концентрации триплетных состояний ФС и концентрации кислорода в ткани. Чувствительность АЗФ к изменению концентрации кислорода в тканях выше, чем ТЗФ или ФФ. Это делает целесообразным использование именно АЗФ для мониторинга оксигенации тканей. Характерное время растворения кислорода в тканях *in vitro* составляет несколько секунд.

Влияние окружения на люминесценцию молекул ФС отражается на спектральных характеристиках излучения. Наблюдается незначительный сдвиг максимума флуоресценции красителей в длинноволновую область в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями и водными растворами.

В четвертой главе представлены результаты исследований особенностей длительной люминесценции ФС при изменении содержания кислорода в тканях *in vitro* и *in vivo* в ходе фотодинамических реакций. При импульсно-периодическом возбуждении ФС в тканях обнаружен эффект светового тушения замедленной флуоресценции (СТЗФ). Суть эффекта состоит в следующем. Образующийся в результате тушения T_1 состояний ФС синглетный кислород в тканях участвует не только в $(T_1 + {}^1O_2)$ аннигиляции, но и в конкурирующих фотодинамических реакциях. Поэтому, после каждого возбуждающего импульса концентрация кислорода в ткани уменьшается. Израсходованный кислород восполняется за счет диффузии из атмосферы (*in vitro*) или из кровотока (*in vivo*). Процесс восполнения исходного содержания кислорода требует определенного времени. Если ФС в ткани возбуждать серией импульсов с периодом между импульсами короче, чем время восстановления израсходованного кислорода, то с каждым последующим импульсом интенсивность АЗФ будет уменьшаться.

Эффект СТЗФ наглядно проявляется в окрашенных тканях мышей при импульсно-периодическом возбуждении ФС с частотой выше 1 Гц (рис. 3). При неизменной плотности мощности возбуждающего света, интенсивность ЗФ в интервале времени 0 – 10 мкс, уменьшается тем быстрее, чем выше частота следования импульсов. Заметим, что СТЗФ обратимый процесс. Представленные изменения кинетики ЗФ аналогичны показанным на рис. 1,

когда наблюдалось тушение ЗФ при форсированной деаэрации камеры с исследуемыми образцами. На рис. 4 показано изменение спектров длительной люминесценции после 1-го и 7-го импульсов в сравнении со спектрами при инкубации того же образца в азоте. Видно, что в отличие от ЗФ интенсивность ФФ меняется незначительно.

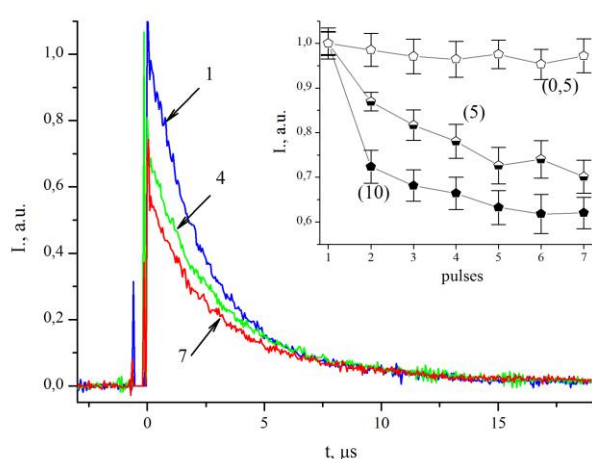


Рисунок 3 – Кинетика затухания ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши после 1-го, 4-го и 7-го возбуждающих импульсов. Частота следования возбуждающих импульсов 5 Гц. Во врезке: изменение интенсивности АЗФ от импульса к импульсу того же образца при частотах возбуждения 10, 5 и 0,5 Гц

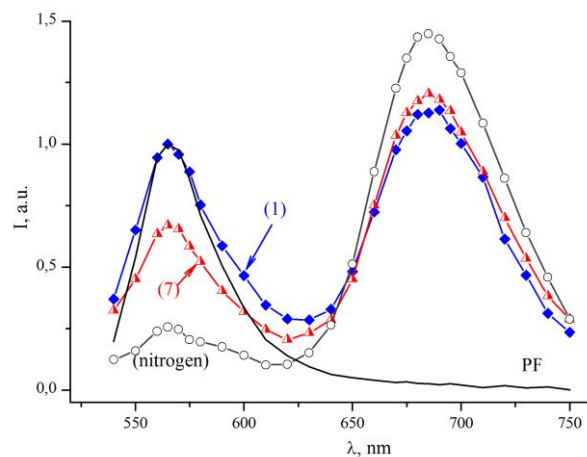


Рисунок 4 – Спектры замедленной люминесценции эритрозина в опухоли молочной железы мыши после первого (1) и седьмого (7) возбуждающих импульсов в серии (период возбуждения равен 0,2 с) и в атмосфере азота (nitrogen). Сплошной чёрной линией показан спектр быстрой флуоресценции (PF) эритрозина в том же образце.

СТЗФ наблюдается в злокачественных опухолях молочной железы значительно чаще, чем в тканях здоровых животных. Для малигнанных образцов СТЗФ вполне можно считать типичным, так как практически в 90 % опухолей наблюдается эффект, в то время как в здоровых образцах молочной железы СТЗФ не происходит. Возможно, в тканях с патологией накапливается большее количество ФС по сравнению с аналогичными здоровыми тканями, что может обуславливать более интенсивное протекание фотодинамических процессов в них. Для тканей с другими патологиями (воспаление, аллергия, опухоль) вопрос пока остаётся открытым, так как статистических данных на текущем этапе исследований недостаточно.

СТЗФ не является результатом фотохимических превращений ФС. Это утверждение базируется на следующих экспериментальных фактах. Во-первых,

концентрация ФС после нескольких возбуждающих импульсов остаётся неизменной, поскольку эффект СТЗФ является обратимым (картина тушения полностью воспроизводится при соблюдении длительных пауз между сериями возбуждений). Во-вторых, концентрация триплетных возбуждений ФС от импульса к импульсу не изменяется, что следует из кинетики ФФ при тех же условиях возбуждения: начальная интенсивность ФФ остаётся постоянной для всех кривых в серии. В-третьих, в широком спектральном диапазоне не было обнаружено новых полос люминесценции, которые могли бы свидетельствовать о структурных изменениях красителя.

СТЗФ обусловлено потреблением СК в ткани, когда некоторая доля химически активного СК неразрывно связывается с тканевыми структурами (предположительно белками), в результате чего концентрация кислорода в ткани уменьшается. Известно, что многие опухоли отличаются высоким уровнем анаболизма и повышенной продукцией белков, устойчивость которых к окислительному действию СК может быть снижена из-за стрессовых условий в самой ткани. Активные окислительные реакции с участием СК в ходе интенсивного облучения наблюдались для ксантовых красителей в белковых растворах. Белки могут служить не только тушителями СК, но также выступать основой для связывания ФС. Связывание ксантовых красителей белками является наиболее вероятной причиной отсутствия признаков ТТА в наблюдаемой кинетике ЗФ.

Для описания СТЗФ предложена кинетическая модель процессов фотосенсибилизации и химического расходования СК, включающая диффузионные операторы для учёта миграции кислорода к неподвижным триплетным центрам. Диффузия кислорода в ткани *in vitro* осуществлялась только из атмосферы через границу раздела вдоль единственной координаты x (толщины образца). Система уравнений имеет следующий вид:

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

где n_T , n_Σ , n_Δ – концентрации триплетных возбуждений ФС, невозбуждённого триплетного и возбуждённого СК соответственно; D_Σ , D_Δ – коэффициенты диффузии для обоих типов кислорода; τ_T , τ_Δ – времена жизни возбуждённого триплетного состояния красителя и СК; $k_{\Sigma T}$ – константа скорости образования СК, $k_{\Delta T}$ – константа скорости СТА, k_q – константа скорости необратимого тушения СК.

Упростить задачу (1) можно, разделив её на две: кинетическую и диффузионную. По экспериментальным данным, время протекания фотодинамических процессов ограничено десятками микросекунд, а ощутимая оксигенация тканей происходит за секунды и десятые доли секунд (в эксперименте использовались интервалы 0,1 – 0,2 сек между возбуждениями). Поэтому фотодинамические процессы рассматривались без диффузионных операторов, только на отрезках 0 – 20 мкс после возбуждения. В оставшееся время между возбуждающими импульсами решалось только уравнение диффузии с одной границей раздела (контакт с атмосферой) в предположении, что потребления СК уже не происходит, а величины D_Σ , D_Δ совпадают.

Решение (1) дает послойное распределение кислорода, складывающееся после каждого акта оксигенации и деоксигенации образца. Потребление СК учтено слагаемым, содержащим k_q . Для произвольного импульса с порядковым номером m , если к этому времени распределение кислорода по толщине образца $N_m(x)$, ($N_T(x)$ – начальное распределение триплетных возбуждений в образце) для триплетных возбуждений:

$$n_T^m(x, t) = N_T(x) \exp(-\alpha_m t) \quad (2)$$

и для синглетного кислорода:

$$\begin{aligned} n_\Delta^m(x, t) = N_T(x) N_m(x) \exp \left\{ -\frac{t}{\tau_\Delta} - k_q t - \beta_m(x) [1 - \exp(-\alpha_m t)] \right\} \times \\ \times \int_0^t \exp \left\{ \left(\frac{1}{\tau_\Delta} + k_q - \alpha_m \right) z + \beta_m(x) [1 - \exp(-\alpha_m z)] \right\} dz \\ \alpha_m = \frac{1}{\tau_T} + k_{\Sigma T} N_m(x) \\ \beta_m(x) = \frac{k_{\Sigma T} + k_{\Delta T}}{\alpha_m} n_T^0(x) \end{aligned}$$

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

$$I_{DF}^m(t) = A_1 \int_0^l n_{\Delta}^m(x,t) n_T^m(x,t) dx + A_2 \int_0^l n_T^m(x,t) dx \quad (3)$$

$$I_{Phos}^m(t) = A_3 \int_0^l n_T^m(x,t) dx \quad (4)$$

где A_1, A_2, A_3 – положительные коэффициенты.

В описанной модели предполагалось, что кислород имеет равный доступ ко всем молекулам зонда. В этом случае модель удовлетворительно описывает тушение АЗФ, однако время жизни триплетных возбуждений при этом оказывается меньше, чем наблюдаемое в эксперименте. Кроме того, расчётные кинетики ТЗФ и ФФ более заметно реагируют на снижение концентрации кислорода. Поэтому целесообразно ввести предположение о молекулах ФС, экранированных субстратом и недоступных для кислорода. В подобном состоянии ФС сохраняют способность к послесвечению, формируя в кинетике затухания ФФ (ТЗФ) некую постоянную составляющую. К этой составляющей добавляется свечение доступных для кислорода молекул, интенсивность которого изменяется при варьировании содержания кислорода. С учетом ФС, недоступных для кислорода, для второго слагаемого в (3) и в выражении (4) для n_T^m требуется добавить еще одну экспоненту:

$$n_T^m(x,t) = n_T^0(x) \{ B_1 \exp(\alpha_m t) + B_2 \exp(-\gamma t) \} \quad (5)$$

где B_1, B_2, γ – положительные константы. В этом случае результаты расчетов удовлетворительно укладываются на экспериментальные кривые. Наличие недоступных для кислорода ФС также позволяет понять, почему при очевидном расходе кислорода в ткани, что отражается на интенсивности АЗФ, изменения в кинетике ФФ могут не наблюдаться: имеет место конкуренция ФФ фотосенсибилизаторов, контактирующих и не контактирующих с кислородом.

Наличие постоянной компоненты ФФ и ТЗФ снижает информативность собственного мономолекулярного свечения ФС к изменению содержания кислорода в тканях, так как только часть триплетных возбуждений реагирует на изменения уровня кислорода в системе.

На основе эффекта СТЗФ предложен следующий альтернативный способ флуоресцентной дозиметрии в фотодинамической терапии (ФДТ). Эффективность фотодинамического действия, вызванного коротким одиночным лазерным импульсом, можно оценить как

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

где E – масса окисленного содержимого, Q – размерный коэффициент, $n_{\Delta}(t)$ – концентрация СК, τ – время жизни СК. Предполагается, что концентрация мишеней для окисления остается неизменной. Если обозначить через E^* массу содержимого, окисленного следующим импульсом, то выражение

$$\Delta E = E - E^* = Q \int_{\Delta t} [n_{\Delta}(t) - n_{\Delta}^*] dt \quad (6)$$

даёт изменение эффективности фотодинамического действия при каждом последовательном шаге облучения ткани лазерным импульсом. Учитывая, что в ткани возможны различные локализации ФС, в том числе и недоступные для подвижного кислорода, то с учётом (6)

$$\Delta E = Q \int_{\Delta t} [n_{\Delta}(t) - n_{\Delta}^*(t)] dt = \frac{Q}{A_1} \int_{\Delta t} \frac{I_{DF}(t) - I_{DF}^*(t)}{n_T^L(t)} dt \quad (7)$$

где $n_T^L(t)$ – концентрация триплетных возбуждений, локализованных в недоступных для кислорода областях. Звёздочкой помечены концентрация СК и интенсивность ЗФ, соответствующие второму импульсу возбуждения. Выражение (7) не даёт непосредственного значения эффективности процесса ФДТ, однако из него видно, что, наблюдая за разницей $I_{DF}(t) - I_{DF}^*(t)$, можно судить о влиянии параметров облучения (энергия и частота возбуждения) на эффективность лечения.

Таким образом, использование явления СТЗФ в ФДТ может оказаться продуктивным, так как измерение не представляет технических трудностей, а предлагаемая методика даёт возможность оценки эффективности облучения непосредственно во время сеанса.

С помощью АЗФ можно отслеживать не только снижение концентрации кислорода в тканях, но и обратный процесс – восстановление исходного содержания кислорода

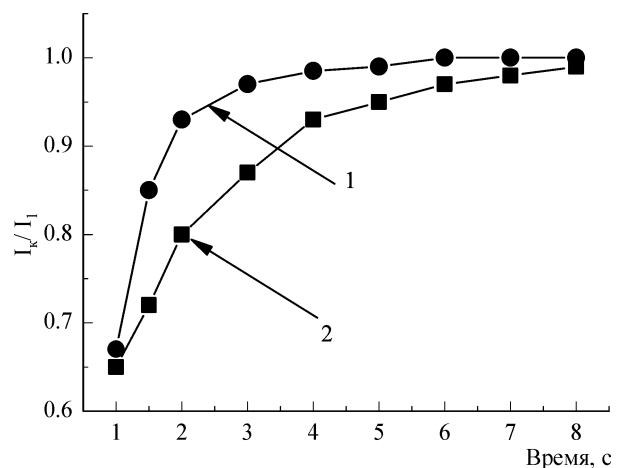


Рисунок 5 – Кривые восстановления исходной интенсивности АЗФ бенгальского розового в ткани мышцы мыши после лазерного облучения *in vivo* (1) и *in vitro* (2)

после фотодинамического действия. В результате облучения ФС в тканях серией лазерных импульсов, интенсивность их АЗФ (из-за уменьшения содержания кислорода в ткани) уменьшается. Если с помощью одиночного «контрольного» импульса, подаваемого на образец после окончания серии возбуждения с регулируемой задержкой, записывать кинетику АЗФ и оценивать, насколько она приблизилась к кинетической кривой после первого импульса, можно получить наглядную временную картину восстановления интенсивности АЗФ (содержания кислорода в ткани) до первоначального значения (рис. 5). Как видно, время восстановления исходного содержания кислорода после окончания фотодинамических процессов в тканях *in vivo* из кровотока почти вдвое короче, чем в тканях *in vitro* за счет атмосферы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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

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

3. При периодическом возбуждении ФС серией наносекундных лазерных импульсов, в биологических тканях наблюдается тушение АЗФ. Тушение АЗФ обусловлено тем, что убыль синглетного кислорода в тканях в ходе фотодинамических реакций превышает приток кислорода в ткань из

кровотока или внешней среды. В результате перед началом каждого последующего импульса исходная концентрация кислорода в ткани оказывается меньшей, чем предыдущего. Уменьшение концентрации кислорода в ткани сопровождается уменьшением интенсивности АЗФ. С ростом частоты следования возбуждающих импульсов эффективность тушения АЗФ возрастает.

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

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

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

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

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

ПУБЛИКАЦИИ ПО ИТОГАМ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

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

1. Летута, С.Н. Непрерывный мониторинг содержания кислорода в тканях *in vivo* / С.Н. Летута, А.Т. Ишемгулов, У.Г. Летута, С.Н. Пашкевич // Биофизика. – 2018. – № 62 (5). – С. 997-1003. doi: 10.1134/S0006302918050186

2. Ишемгулов, А.Т. Длительная люминесценция сенсibilизаторов в условиях дефицита кислорода в тканях при фотодинамическом эффекте / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, Э.К. Алиджанов, Ю.Д. Лантух // Оптика и спектроскопия. – 2017. – Т. 123. – Р. 818–824. doi: 10.7868/S0030403417110095

3. Letuta, S.N. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry // S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, Yu.D. Lantukh, E.K. Alidzhanov, S.S. Sokabaeva, V.V. Bryukhanov // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2016. – V. 163. – P. 231–236. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.036

Публикация в рецензируемом научном журнале из списка ВАК РФ:

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

Тезисы докладов в сборниках конференций и семинаров:

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

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

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

8. Ишемгулов, А.Т. Особенности замедленной люминесценции эритрозина при изменении концентрации кислорода в биологических тканях / А.Т. Ишемгулов, С.С. Сокабаева // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов: в 2 т. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2015. ISBN 978-5-9275-1656-8. Т. 2: 2015. – С. 235.

9. Ишемгулов, А.Т. Фосфоресценция и длительная флуоресценция эритрозина в биологических тканях / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.С. Сокабаева, А.Ф. Муханова // Экспериментальная и теоретическая биофизика '15. Сборник тезисов. – Пушино: Типография Fix-Print, 2015. – 202 с. ISBN 978-5-81652-389-9. – С. 23.
10. Летута, С.Н. Световое тушение замедленной флуоресценции фотосенсибилизаторов в окрашенных тканях животных / С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.Т. Ишемгулов, А.А. Чакак // Сборник материалов Международной научной конференции «Наука и образование: фундаментальные основы, технологии, инновации», посвященной 60-летию Оренбургского государственного университета. Ч. 4. – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2015. – С. 183–187.
11. Ишемгулов, А.Т. Длительная люминесценция зонда как показатель уровня тканевого кислорода в опухолях / А.Т. Ишемгулов, А.Ф. Муханова, С.С. Сокабаева // Современные проблемы физики и технологий. V-я Международная молодежная научная школа-конференция, 18-23 апреля 2016 г.: Тезисы докладов. Часть 1. М.: НИЯУ МИФИ, 2016. – С. 132–135.
12. Ишемгулов, А.Т. Использование аннигиляционной замедленной флуоресценции зонда для оценки содержания кислорода в опухолях / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, А.Ф. Муханова, С.Н. Пашкевич, С.С. Сокабаева // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: материалы XI международной научно-технической конференции, г. Севастополь, 25-29 апреля 2016 г.: в 2 т. Т. 2. – Севастополь: СГУ, 2016. – С. 113–116.
13. Ishemgulov, A.T. Oxygen dynamic's control in biological tissues by singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence / A.T. Ishemgulov, S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.F. Mukhanova, S.S. Sokabaeva // International symposium "Fundamentals of Laser Assisted Micro- and Nanotechnologies" (FLAMN-16): Proceedings. June 27 – July 01, 2016. ITMO University, St. Petersburg, Russia, 2014. – 150 p.
14. Ishemgulov, A.T. Oxygen-dependent delayed luminescence of mice mammary tissues stained by erythrosine / A.T. Ishemgulov, A.F. Mukhanova // Books of Abstracts of the 4-th International Symposium "Molecular Photonics" dedicated to academician A.N. Terenin July 21 – 24, 2016, Peterhof, St. Petersburg, Russia: VVM publishing Ltd., 2016. – 95 pp. – ISBN 978-5-9651-0990-6. – 40 p.
15. Летута, С.Н. Длительная люминесценция экзогенных молекул-зондов в живых клетках и тканях / С.Н. Летута, Э.К. Алиджанов, А.Т. Ишемгулов, Ю.Д. Лантух, С.Н. Пашкевич // XXVIII Симпозиум «Современная химическая физика». Сборник аннотаций. 19 – 30 сентября 2016 года, Пансионат «Маяк», г. Туапсе. – ISBN 978-5-85493-195-3. – С. 103.
16. Chakak, A.A. The effect by the light quenching of the delay fluorescence of dye molecules in tissues / A.A. Chakak, A.T. Ishemgulov, S.N. Letuta, S.N. Pashkevich // The 13th Nano Bio Info Chemistry Symposium and the 8th Japanese-Russian Seminar on Chemical Physics of Molecules and Polyfunctional Materials. Program and Abstract Book, 2016. – P. 2C1a.
17. Летута, С.Н. Исследование кинетики замедленной люминесценции эритрозина в тканях мышей *in vitro* / С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич, А.А. Чакак,

А.Ф. Муханова, С.С. Сокабаева, А.Т. Ишемгулов // Сборник материалов конференции «Наука и образование: фундаментальные основы, технологии, инновации» – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2017. – С. 1828–1831.

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

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

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

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

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

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

24. Ишемгулов, А.Т. Отслеживание уровня кислорода в тканях *in vivo* с использованием аннигиляционной замедленной флуоресценции / А.Т. Ишемгулов, С.Н. Летута, С.Н. Пашкевич // Современные проблемы физики и технологий. VI-я Международная молодежная научная школа-конференция, 16-21 апреля 2018г.: Тезисы докладов. Часть 2. М.: НИЯУ МИФИ, 2018. – С. 65.

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