

УДК 532.783:548.0:541.12:541.15:538.6

Л. В. Ельникова

МЕТОДЫ КОМБИНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

COMPLEX IRRADIATION METHODS IN PHOTODYNAMIC THERAPY

ФГУП «ГНЦ РФ Институт теоретической и экспериментальной физики
им. А. И. Алиханова», Госкорпорации «РОСАТОМ»
117218 Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 25

В данной работе представлен анализ возможностей комбинированного использования позитронного и оптического облучения живых клеток в задачах фотодинамической терапии (ФДТ). Цели и задачи ФДТ заключаются в уничтожении или необратимом окислительном повреждении патогенных клеток, или скорее, клеточных стенок, клеточных мембран, пептидов и нуклеиновых кислот фотоактивированным кислородом фотосенсибилизатора, введенного в клетку-мишень непосредственно перед световым воздействием. В настоящей работе на основании сведений из литературы обсуждаются схемы совместного использования ядерно-физического метода позитронной аннигиляционной спектроскопии (ПАС) времени жизни в процессе регистрации клеточных повреждений в цикле ФДТ на примере грам-положительных и грам-отрицательных бактерий.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, активные формы кислорода, бактериальные мембраны, спектроскопия позитронной аннигиляции.

In this article, combined application of positron and visible light irradiations of bioplast in the photodynamical therapy (PDT) is analyzed. The objectives and goals of PDT consist in destruction or irreversible oxidative damage of pathogenic cells, or rather cell walls, cell membranes, peptides, and nucleic acids by photo-activated oxygen of photosensitizer injected into the target-cell during light irradiation. The arguments for involving of lifetime positron annihilation spectroscopy to control photodamaging of cells in the course of the PDT procedure are given on the examples of gram-positive and gram-negative bacteria basing on a brief survey of the literature.

Key words: photodynamical therapy, activated oxygen, bacterial membranes, positron annihilation spectroscopy.

Введение

Одним из наиболее актуальных медицинских приложений для взаимодействия облучения с живыми организмами может быть фотодинамическая терапия (ФДТ), комбинированная с методами позитронной аннигиляционной спектроскопии.

В ФДТ используется свет абсолютно всех диапазонов длин волн в сочетании с фоточувствительным агентом (фотосенсибилизатором) для индуцирования фототоксической реакции, приводящей к смерти или необратимому повреждению патогенных

клеток. Антибактериальная ФДТ, примененная в системах клеток бактерий и дрожжей, продемонстрировала удовлетворительные результаты в дерматологии [1]. В настоящее время ФДТ является первым конкурентом методам лечения антибиотиками. И если бы пенициллин, открытый Флемингом в 1928 году, не получил повсеместного распространения в медицине антибиотиков, ФДТ, впервые апробированная в 1904, возможно не была бы забыта.

В ФДТ реакции фотосенсибилизации – это процессы, в которых поглощение света фотосенсибилизатором (или красителем) индуцирует химические изменения во внешних стенках вблизи поверхности некоторых типов клеток бактерий и дрожжей, увеличивает их проницаемость и позволяет значительному количеству фотосенсибилизатора (ФС) аккумулироваться на уровне цитоплазматической мембраны. Возможно протекание двух типов ФДТ реакций, через радикальный механизм (тип I) и через перенос энергии для стимуляции образования реактивного синглетного кислорода (тип II). Бактериальные клетки-мишени классифицируются как грам-положительные (Gram (+), например, *murein sacculus*) и грам-отрицательные (Gram (-), например, *Escherichia coli* (*E. coli*)), они отличаются друг от друга структурой и толщиной слоя пептидогликанов. Положительный заряд красителя ФС образуется для прототирования плотного электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными участками внешней поверхности многих типов бактериальных клеток.

Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ впервые наблюдался в 1924 году. В 1931 Каутский впервые предположил, что $^1\text{O}_2$ может являться промежуточным звеном в фотоокислении сенсibilизированного красителя [2]. Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ – это несколько метастабильных состояний триплетного кислорода O_2 , но с более высокой энергией, они менее стабильны, чем триплетный кислород O_2 . Так разность энергии самого низкого уровня синглетного кислорода и самого низкого уровня триплетного кислорода составляет 11400 К ($T_e(a^1\Delta_g \leftarrow X_3\Sigma_g^-) = 0,98 \text{ эВ} = 94,2 \text{ кДж/моль}$) и соответствует переходу в ближнем ИК-диапазоне ($\approx 1270 \text{ нм}$).

Теория молекулярных орбиталей предсказывает три низколежащие возбужденные синглетные состояния триплетного молекулярного кислорода $\text{O}_2(X_3\Sigma_g^-) : \text{O}_2(a^1\Delta_g)$, $\text{O}_2(a^1\Delta'_g)$ и $\text{O}_2(b^1\Sigma_g^+)$, которые отличаются друг от друга только спинами и заполнением разрыхляющих вырожденных орбиталей π_g . Среди этих состояний именно $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ принято называть «синглетным кислородом», поскольку это состояние невырожденное и наиболее долгоживущее. Благодаря различию электронных оболочек синглетный и триплетный кислород обладают разными химическими свойствами. Время жизни синглетного кислорода в вакууме равно 72 минутам, и значительно меньше в среде. Синглетный кислород вступает в реакцию с многими типами биомолекул, в том числе, с ДНК, протеинами и липидами [3].

Методы позитронной аннигиляционной спектроскопии (ПАС) относятся к ядерно-физическим методам исследования структуры вещества наряду с оптической, нейтронной и рентгеновской спектроскопией, эти методы основаны на регистрации позитронных и позитрониевых состояний, изменяющихся в зависимости от свойств среды. Позитрон – античастица по отношению к электрону. При облучении позитронами вещества возможны процессы аннигиляции, которые протекают через связанные состояния позитронов с электронами, атомами, молекулами и различными дефектами. Простейшая связанная двухчастичная система (позитрон – электрон, e^+e^-) называется «позитроний» (Ps) [4], он является полным структурным аналогом водородного атома. Существуют два основных состояния позитрония, триплетное, или орто-позитроний

(*o*-Ps) и синглетное, или *para*-позитроний (*p*-Ps), в первом случае спины электрона и позитрона параллельны, а во втором – антипараллельны.

Некоторые приложения метода ПАС как новой неразрушающей техники для определения молекулярного повреждения под действие УФ-облучения описаны в [5] и ссылках. Эксперименты на мышах, облученных УФ-светом [5], и пораженных раком коже [6] ярко демонстрируют перспективность метода ПАС в медицине.

Как наблюдалось в эксперименте [5], долгоживущие компоненты *орто*-позитрония (*o*-Ps) проникают на глубину 10 – 15 нм во внешний слой клетки. Предполагается, что такие масштабы сопоставимы с проникновением кислорода фотоактивированного красителя во внешний слой грам-отрицательных бактерий, они достаточно точно соответствуют размерам пуринов и липополисахаридов.

Такие данные мотивируют дальнейшие исследования в направлении применения методов ПАС в фотодинамической терапии. Для будущих экспериментальных подтверждений сказанного и реализации конкретных медицинских задач необходимо провести оценки позитронных состояний и реакций позитрония в фотоактивированных системах. Настоящая статья представляет анализ одной из модельных систем, фотооблученной бактерии *E. coli* и порфиринового фотосенсибилизатора, мезозамещенного 4 N-метил-пиридина (Т₄МРyP), в присутствии агента Tris-EDTA и соответствующих ожидаемых позитронных спектров.

Пробная система с грам-отрицательной бактерией в цикле ФДТ

Рассмотрим фотосенсибилизацию *E. coli* видимым светом от 250 ваттных ртутных ламп для красителя Т₄МРyP согласно процедуре фотоактивации (рис. 1, 2). Присутствие агента Tris-EDTA [1, 7] должно служить увеличению мембранной проницаемости и способствовать проникновению фототоксичных молекул в цитоплазматическую мембрану.

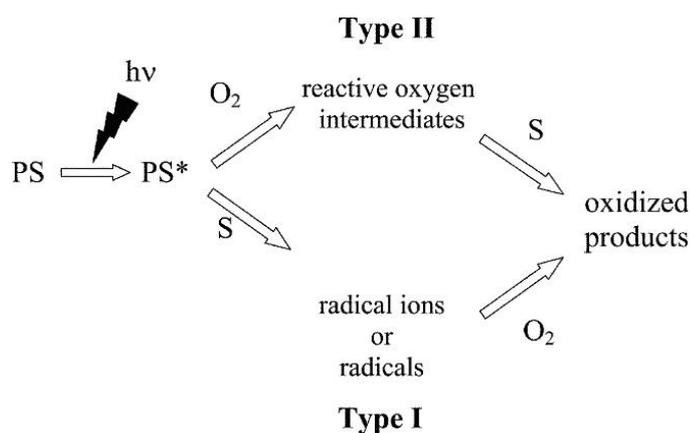


Рис. 1. Поглощение света фотосенсибилизатором (PS) посредством реакций типа I и II. После активации светом ($h\nu$) основного состояния ФС, его активные формы (PS*) могут участвовать в альтернативных реакциях двух типов: с образованием реактивного синглетного кислорода 1O_2 , пероксида водорода, гидроксильного радикала (тип II) или органического субстрата (S) (тип I). Промежуточные продукты быстро вступают в реакцию с ближайшим окружением (пептидами, нуклеиновыми кислотами, клеточными стенками и мембранами); рисунок заимствован из [1]

Добавление агента Tris-EDTA к грам-отрицательным бактериям необходимо для удаления двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}), которые присутствуют в большом количестве для стабилизации соседних отрицательно заряженных молекул липополисахаридов на внешней стороне мембраны.

Обычно клетки инкубируются в 8,4 мкМ порфириновом растворе (1 мл) в течение 5 минут при 37 °С, клеточные гранулы промываются однократно в 5 мМ фосфатном буфере при pH = 7,4 и очищаются 2 % водным раствором додецилсульфата натрия (SDS) для того, чтобы разрушить клетки и обеспечить слияние порфиринов в мономерное состояние сурфактантных мицелл.

Максимум поглощения T_4MPyP достигается на длине волны 424 нм, его коэффициент экстинкции равен $194 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а соответствующий квантовый выход синглетного кислорода равен 0,74 [7].

В стандартной пробирке «Пирекс» (Pyrex) помещается 10^6 клеток/мл. Выживаемость клеток контролируется согласно стандартной процедуре [7]. В течение времени облучения 1, 5 и 10 минут T_4MPyP молекулярной массы 8,4 микромоль убивает соответственно 0,0, 3,1 и 4,5 клеток *E. coli*.

Облученные клетки и позитрониевые состояния

Из биохимического анализа фотооблученных клеток предполагается [8], что цитоплазматическая мембрана является наиболее важным целевым объектом фотопроцесса. Чтобы поразить эту мембрану извне, синглетный кислород должен разрушить внешний слой клетки (рис. 2).

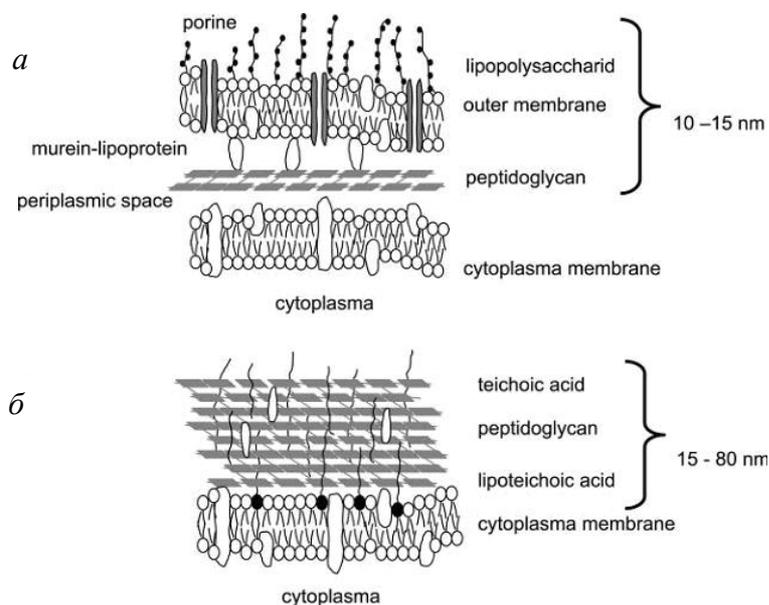


Рис. 2. Строение клеточной стенки грам-отрицательных (а) и грам-положительных (б) бактерий. Клеточная стенка грам (-) бактерий содержит толстый внутренний слой, составленный из 2 – 3 слоев пептидогликана (толщиной 2 – 3 нм), периплазматическое пространство и внешний липидный бислой (7 нм). Внешняя мембрана содержит фосфолипиды, липопротеины, липополисахариды и протеины, такие как пурины (а). Клеточные стенки грам (+) бактерий имеют толщину около 15 – 80 нм, они составлены из 100 взаимопроницающих слоев пептидогликана (б). Тейхоевые кислоты «вплетены» в пептидогликанные слои, к некоторым из них присоединены липиды [1]

В частности, в результате повреждения должен произойти фазовый переход или образование пор во внешнем липидном слое клетки. В этой связи уместно вспомнить исследования методами ПАС, доплеровского уширения спектральной линии и временного метода липидов DPPC (DP- α дипальмитоилфосфатидилхолина) [9] и бактерий *Stratum corneum* [10], хотя и проводившихся вне конкретных терапевтических задач.

Далее рассмотрим основные результаты фотодеструктивных реакций фотосенсибилизаторов и химических агентов в структуре бактериального слоя, а также образование Ps в системах после оптического облучения.

Роль синглетного кислорода

Синглетный кислород с его главной ролью в фотопроцессе [1], в данном случае вырабатывается порфириным ФС T₄MPyP (рис. 3).

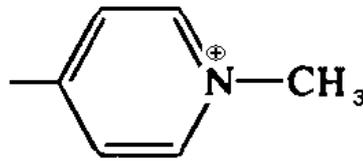
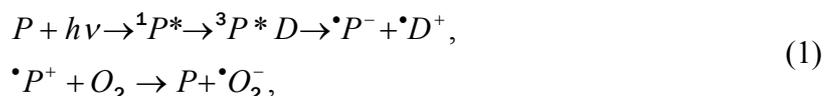


Рис. 3. Структурная формула порфирина T₄MPyP

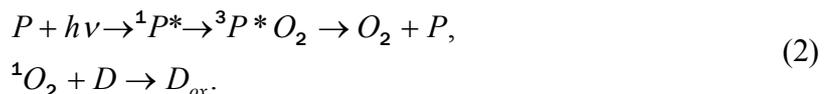
T₄MPyP является катионным порфирином с зарядом от +2 до +4. После нейтрализации всего внешнего слоя химическими или биологическими агентами можно приближенно считать клетку-мишень химически нейтральной, подготовленной к внесению ФС и световому облучению.

В приближении модели Орэ, согласно которой молекулярный триплетный кислород в основном состоянии ингибирует образование позитрония [11] по механизму диссоциативного захвата, в котором энергии и сечения захвата есть $E_{max I} = 6,2$ эВ, $E_{max II} = 8,3$ эВ, $\sigma_{max I} = \sigma_{max II} = 1,3 \cdot 10^{-18}$ см², соответственно. Кроме того общепризнанным является эффект тушения позитрония кислородом [4, 11].

Фотодинамические реакции, основанные на первичном порфирином фотовосстановлении иона окисляющим составом, являются примером механизма типа I (рис. 1), где молекулярный кислород играет роль акцептора электрона [12]:



где P, ¹P* и ³P* – молекулы ФС в основном, возбужденном синглетном и триплетном состояниях, D – субстрат, фотообогащенный кислородом. В альтернативном механизме типа II первичным является перенос энергии от триплетных фотосенсибилизаторов к O₂ с заполнением его синглетного состояния ¹Δ_g (¹O₂); тогда синглетный кислород окисляет соответствующие субстраты [12]:



Кинетика фосфоресценции после облучения описывается уравнением [12]:

=====

$$L(t) = \frac{k_{gen} [{}^3P]_0 [O_2]}{\tau_r (\mathbf{1}/\tau_t - \mathbf{1}/\tau_\Delta)} [e^{-t/\tau_\Delta} - e^{-t/\tau_r}] , \quad (3)$$

где k_{gen} – константа скорости реакции переноса энергии от ${}^3P^*$ к O_2 , в результате которой образуется синглетный кислород 1O_2 , τ_r – радиационное время жизни 1O_2 ; τ_Δ – реальное время жизни 1O_2 , τ_t – время жизни ${}^3P^*$; $[{}^3P]_0$ – концентрация молекул триплетного ФС сразу после облучения; $[O_2]$ – концентрация кислорода в растворе.

Для некоторых агентов найдено (см. ссылки в [12]), что тушение флуоресценции фотоактивированного 1O_2 подчиняется уравнению Штерна-Вольмера, которое представлено в упрощенном виде:

$$\tau_\Delta = \mathbf{1} / k_q C_{max} , \quad (4)$$

где C_{max} – молярная концентрация чистого растворителя, используемого в качестве тушителя Ps. В различных растворителях τ_Δ лежит в пределах 10 – 250 мкс.

Например, при облучении лазером на иттрий-алюминиевом гранате с неодимом (Nd-Yag) с длиной волны 532 нм, флуоресценция фотосенсибилизированного синглетного кислорода в воздушно-насыщенной D_2O для порфиринового ФС тетра-(*p*-сульфофенила) пик достигается за ~ 10 мкс после лазерной вспышки.

В [12] и ссылках в ней доказано наличие флуоресценции, испущенной сольватированными молекулами 1O_2 в воде H_2O , посредством сравнения спектров 1O_2 с его спектрами в газовой фазе.

Квантовый выход φ_{ph} можно выразить как:

$$\varphi_{ph} = \varphi_\Delta \varphi_r = \varphi_\Delta t_\Delta / t_r , \quad (5)$$

где φ_Δ – квантовый выход фотосенсибилизатора, производящего 1O_2 , φ_r – квантовый выход флуоресценции 1O_2 , t_r – радиационное время жизни 1O_2 . Интенсивность в нулевой момент времени (I_0 , квант в секунду) вычисляется экстраполяцией распада флуоресценции до «нулевого времени» [12]:

$$I_0 = I_{las} \varphi_\Delta / t_r , \quad (6)$$

где I_{las} – число квантов, поглощенных ФС в течение лазерной вспышки.

Полный выход флуоресценции в растворе ФС значительно меньше, чем 100 %. Квантовые выходы флуоресценции в водородосодержащих растворителях составляют 0,02 % и менее. Самый низкий φ_{ph} оказался в воде и природной среде живых организмов.

Экспериментальное наблюдение флуоресценции 1O_2 в случае мыши с имплантированной раковой опухолью проводилось с агентом Photofrin II и тетра-метилпиридил порфином (tetra methyl pyridyl porphin, TMPP, $10^{-4}M$) [13] в водном фосфатном буфере. Паркер [13] применял лазер на красителях (модели Lexel Model 700L), генерирующий свет в диапазоне от 600 до 700 нм, и измерял при фиксированной длине волны 630 нм, средняя мощность лазера была 20 мВт. В растворе TMPP различалась фотосенсибилизированная флуоресценция на длине волны 1270 нм. Паркер получил $\tau_\Delta = 3,2$ мкс и $\tau_r = 2,4$ мкс. В обзоре [12], составленном до 1998 года, можно встретить описание прочих агентов, ФС и объектов – мишеней.

Константа скорости взаимодействия 1O_2 с биомолекулами может быть измерена, используя химические ловушки 1O_2 [14 – 16] или тушение флуоресценции 1O_2 (в биологических тушителях, таких как глицин, триптофан и пр., k_q составляет величину по-

рядка 10^7-10^8 (см. ссылки в [12])). Константа скорости тушения $^1\text{O}_2$ нуклеотидами, сахарами и органическими кислотами приблизительно равна 10^4-10^7 .

Таким образом, квантовый выход синглетного кислорода служит критерием клеточного повреждения.

С другой стороны, молекулы кислорода – это очень эффективные тушители образования позитрония [11], имея два неспаренных электрона в основном состоянии, молекулярный кислород O_2 демонстрирует оба типа тушения (с переворотом спина и без него).

В жидкой фазе указанные эффекты тушения позитрония (которые выражаются в уменьшении τ_2 в спектре Ps) описываются константой тушения [4]:

$$\sigma_q v = (\sigma_q v)_{gas} + KPs_{\text{O}_2} . \quad (7)$$

Здесь первый член в правой части означает не зависящую от температуры константу конверсии в газовой фазе [1], а второй – константу образования молекулы PsO_2 : $K_{Ps\text{O}_2}$, равную $K_{Ps\text{O}_2}^0 e^{-E/RT}$, где E – энергия активации молекулы среды, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Позитронные аннигиляционные спектры SDS

Децилсульфат Na (SDS), необходимый в рассматриваемом ФДТ процессе, должен быть агрегирован в мицеллярную фазу. В [17] изучен вклад мицеллярного SDS в позитрониевые спектры времени жизни. Временные спектры были представлены в виде 4-х компонент, которые соответствовали *p*-Ps, свободному позитрону e^+ , орто-позитронию *o*-Ps в растворе (*o*-Ps^{aq}) и в органических (*o*-Ps^{org}) мезофазах в возрастающем порядке времен жизни τ_i , $i = 1, 2, 3, 4$.

Количественно константа скорости реакции k_{diff} выражается уравнением Смолуховского:

$$k_{diff} = 4\pi DRN_A / 1000 , \quad (8)$$

где N_A – число Авогадро, $R = R_{Ps} + R_{core}$ и $D = R_{Ps} + R_{mic}$ – сумма радиусов реакции и коэффициентов диффузии реагентов соответственно (см. ссылки в [17]). Каждый коэффициент диффузии может быть выражен как функция гидродинамических радиусов реагентов, R_h : $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$, где k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура

и η – вязкость среды. Процессы перехвата частиц от воды к органическому субстрату *o*-Ps^{org} описаны в [18]:



Без добавления NaCl [17], полная интенсивность, приписываемая *o*-Ps^{aq} есть $I_{tot} = I_3 + I_4 = 22 \pm 0,1$ %. При сравнении с $I_3^0 = 27$ % для чистой воды, видно легкое ингибирование, вызванное полярными головками сульфатов. В присутствии NaCl I_{tot} немного ниже и постоянно, $21,4 \pm 0,1$ %.

Полученные результаты показывают, что τ_1 и τ_2 были постоянными и равными 178 ± 21 и 402 ± 4 пс соответственно. Величина τ_1 значительно выше, чем время жизни, присущее *p*-Ps в вакууме, $\tau_s = 125$ пс ($\lambda_s = 8$ нс⁻¹), $\lambda_3^0 = 1/1,795$ нс⁻¹ при 303 К, $\tau_4 = 3,87 \pm 0,05$ нс [18].

Оценки вкладов липополисахаридов и пуринов в спектры Ps

Некоторые исследования грам-положительных бактерий [8], *Stratum corneum*, посредством ПАС, были направлены на изучение геометрии пор в мембранном слое. Модельный свиной *Stratum corneum*, отделенный посредством нагрева, облучался с поликарбонатом (с временем жизни ПАС $2,103 \pm 0,076$ нс) по схеме «сэндвич» с ^{22}Na источником 0,51 МэВ перед образцом (размерами $15 \times 15 \times 0,5$ мм), изолированным алюминиевой фольгой, в которую был обернут.

Напомним (рис. 2), что толщина внешнего слоя грам (+) бактерий – 15–80 нм. Диаметры пор (от 0,54 до 0,6 нм) в циклодекстринах и поликарбонатах после ПАС измерений [8] оценивались по формуле Тао – Элдрупа.

В противоположность *Stratum corneum*, грам (–) бактерия имеет внешний слой толщиной 10 – 15 нм и проявляет низкую фоточувствительность, вероятно, по причине высокой организации внешней стенки, которая содержит муреины и три-ламеллярные структуры на внешней стороне пептидогликанного слоя [7]. Поэтому для увеличения проницаемости слоя в ФДТ процедуру с грам (–) бактериями включают биологический агент, например, T₄MPyP. Так, логарифмическое уменьшение полной выживаемости облученных клеток *E. coli* в присутствии 8,4 мкМ порфирина T₄MPyP составляет 4,5 после 10 минутного облучения [7, 19]. Однако, поры, различающиеся цилиндрической геометрией, во всех типах бактерий принципиально детектируемы методом ПАС, так что методика, блестяще апробированная на грам (+) бактериальных системах, может быть распространена и на грам (–) бактерии.

Суммарный ожидаемый спектр *E. coli*–T₄MPyP

Известно, что цитоплазма органических клеток (целевой объект фотопроцессов [8]) содержит воду (75 – 85 %), протеины, липиды и другие компоненты средней молекулярной массой 10 – 20 %, 2 – 3 % и 2 % соответственно [12]. Только четыре аминокислоты (триптофан, гистидин, метионин и цистин) активно взаимодействуют с $^1\text{O}_2$, из этого предполагается [12], что молекула протеина содержит 60 остатков активных аминокислот. Плотность цитоплазмы – 1 г/см^3 . Молярные концентрации воды, протеинов и липидов в цитоплазме равны 44, 0,004 и 0,04 М соответственно. Средние величины k_q для активных аминокислот составляют около $2 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Так, полная константа скорости деактивации $^1\text{O}_2$ вычисляется следующим образом [12]: $\sum_g k_g C_g = 5 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$, где

g – индекс компонент. Следовательно, $\tau_\Delta \approx 200$ нс. Активности тушения белковых аминокислот намного больше, чем у липидов и воды, вклад воды в полное тушение составляет 2 – 3 %. Для цитоплазматической мембраны $\tau_\Delta \approx 40$ нс [12]. Диффузионная длина $^1\text{O}_2$ в различных структурах оценивается как:

$$l_\Delta \approx 1 / \sqrt{6D\tau_\Delta}, \quad (10)$$

где D – диффузионный коэффициент $^1\text{O}_2$, для обсуждаемых сред может быть найден в [20]. Так, в воде H₂O, липидной мембране и цитоплазме, $l_\Delta = 1900, 2200$ and 90 \AA соответственно. Сравнение спектральных вкладов компонент представлено в таблице.

Времена жизни компонент o -Ps и $^1\text{O}_2$ в различных агентах ФДТ

| Среда | τ_3 o -Ps, нс | τ_Δ $^1\text{O}_2$, нс |
|--|----------------------|-----------------------------------|
| H ₂ O | 1,8 [21] | 1...4 [12] |
| SDS | 1,795 [18] | – |
| T ₄ MPyP | – | 3200 [13] (TMPP) |
| Внешний слой клеточной мембраны <i>E.coli</i> | – | 50 [12] |
| Цитоплазматическая мембрана <i>E.coli</i> | – | 40 [12] |
| Цитоплазматическая мембрана <i>Stratum corneum</i> | 2,1–2,2 [10] | ~40 [12] |

Замечания аппаратной реализации метода

Применительно к ФДТ имеются определенные особенности комбинированного облучения организмов светом и позитронами.

Обычно эксперименты ПАС с живыми системами [10, 22] проводились в конфигурации образца и позитронного источника (например, ^{22}Na) по типу «сэндвич», причем образцы заранее высушивались. Однако, такая конфигурация не позволяет изучать живые системы в условиях, эквивалентных их естественному жидкофазному окружению, а также вызывает трудности доставки к системе света от лазера или лампы. Альтернативная конструкция объемных образцов в ампулах, когда облучение осуществляется во всем объеме жидкости, обсуждается, например, в [23]. Конструкция ампул защищена патентом ученых ИТЭФ [24].

Заключение

Приведенные выше аргументы доказывают возможность регистрации методом ПАС состояний внешнего мембранного слоя фотоактивированных систем бактериальных клеток, являющихся объектами ФДТ. На основании сказанного можно сделать следующие выводы:

1. Так как времена жизни o -Ps и $^1\text{O}_2$ сравнимы по порядку величины и различны для каждой конкретной среды, можно измерять времена жизни компонент Ps в течение времени фотоактивации синглетным кислородом ФДТ цикла.
2. Сценарий, включающий реакции синглетного кислорода ФДТ в ПАС может быть напрямую апробирован на грам (+) и распространен на грам (–) бактерии.
3. Анонсируется, что для обоих типов бактерий эффект тушения синглетного кислорода будет ослаблен по мере роста числа погибших бактериальных клеток.

~~~~~

Автор благодарит М. Г. Страховскую и проф. В. М. Бякова за стимулирующие обсуждения, а также проф. Ж. Кайчоша за обеспечение литературными данными. Работа выполнена при финансовой поддержке лаборатории 322 ФГУП ГНЦ РФ ИТЭФ Госкорпорации «РОСАТОМ».

### Список литературы

1. Maisch T., Szeimies R. -M., Jori G., Van Lier J. // Photochem. Photobiol. Sci. 2004. Vol. 3. P. 907 – 917.
2. Kearns D. R. // Chemical Reviews 1971. Vol. 71. P. 395 – 427.
3. Briviba K., Klotz L. O., Sies H. // Biol. Chem. 1997. Vol. 378. P. 1259 – 1265.
4. Гольданский В. И. Физическая химия позитрона и позитрония. М. : Наука, 1968. 174 с.
5. Jean Y. C., Chen H., Liu G., Gadzia J. E. // Radiat. Phys. and Chem. 2007. Vol. 76. P. 70 – 75.
6. Jean Y. C., Li Y, Liu G, Zhang J., Gadzia J. E. // Applied Surface Science 2006. Vol. 252. P. 3166 – 3171.
7. Villanueva A., Bertolini G., Jori G. // J. Braz. Chem. Soc. 1995. Vol. 71. P. 123 – 125.
8. Bertolini G., Rossi F., Valduga G. et al. // FEMS Microbiology Letters 2006. Vol. 71. P. 149 – 155.
9. Jean Y. C., Hancock A. J. // J. Chem. Phys 1982. Vol. 77. P. 5836 – 5839.
10. Itoh Y., Shimazu A., Sadzuka Y. et al. // Int. J. of Pharmaceutics 2008. Vol. 358. P. 91 – 95.
11. Ferrell R. A. // Phys. Rev. 1958. Vol. 110. P. 1355 – 1357.
12. Krasnovsky A. A. // Jr. Membr. Cell Biol. 1998. Vol. 12. P. 665 – 690.
13. Parker J. G. // IEEE Circuits and Devices Magazine. 1987. P. 10 – 21.
14. Foote C. Free Radicals in Biology. New York, San Francisco, London : Academic Press, 1976.
15. Lindig B. A., Rodgers M. A. J. // Photochem. Photobiol. 1981. Vol. 33. P. 627 – 634.
16. Matheson I. B. C., Etheridge R. D, Kratowich N. R., Li J. // J. Photochem. Photobiol. 1975. Vol. 21. P. 165 – 171.
17. Bockstahl F., Pachoud E., Duplatre G., Billard I. // Chemical Physics. 2000. Vol. 256. P. 307 – 313.
18. Bockstahl F., Duplatre G. // Phys. Chem. Chem. Phys. 1999. Vol. 1. P. 2767 – 2772.
19. Minnock A., Vernon D. I., Schofield J. et al. // Antimicrob Agents Chemother. 2000. Vol. 44. P. 522 – 527.
20. Fu Y., Kanofsky J. R. // Jr. Photochem. Photobiol. 1995. Vol. 62. P. 692 – 702.
21. Duplatre G., Talamoni J., Abbe J. Ch., Haessler A. // Radiat. Phys. Chem. 1984. Vol. 23. P. 531 – 536.
22. Uchiyama Y., Ito K., Li H.-L., Ujihara Y., Jean Y. C. // J. of Radioanalyt. and Nucl. Chem. 1996. Vol. 211. P. 111 – 117.
23. Duplatre G., Al-Shukri L. M., Haessler A. // J. of Radioanalyt. Chem. 1980. Vol. 55. P. 199 – 211.
24. Графутин В. И. // Патент RU 2 273070. Оpubл. 24.02.2004.

Поступила в редакцию 25.01.2010 г.



SSC RF A.I. Alikhanovs Institute for Theoretical and Experimental Physics,  
Russia, 117218 Moscow, B. Cheremushkinskaya, 25

ФГУП «ГНЦ РФ Институт Теоретической и Экспериментальной Физики  
им. А.И. Алиханова» Госкорпорации РОСАТОМ,  
117218 Москва, Б. Черемушкинская, 25.

Ельникова Лилия Вячеславовна

e-mail: [elnikova@itep.ru](mailto:elnikova@itep.ru)