

¹ Государственное
бюджетное учреждение
здравоохранения
«Санкт-Петербургский
клинический научно-
практический центр
специализированных видов
медицинской помощи

(онкологический)
им. Н.П. Напалкова»
(Санкт-Петербург, Россия)

² Федеральное
государственное
бюджетное учреждение
«Российская академия наук»
(Москва, Россия)

ГЕНЕРАЦИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ЛАЗЕРНЫМ ИК-ИЗЛУЧЕНИЕМ 1273 НМ И ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

А.А. Богданов¹, В.В. Клименко¹, Ан. А. Богданов¹, В.С. Бурдаков¹,
Н.А. Верлов¹, В.М. Моисеенко¹, М.В. Дубина²

GENERATION OF SINGLET OXYGEN BY LASER INFRARED RADIATION 1273 NM AND EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECT ON TUMOR CELL LINES

А.А. Богданов¹
Кандидат физико-математических
наук, заместитель директора по
научной работе ГБУЗ
«СПбКНЦСВМП(о) им. Н.П. Напалкова»,
197758, Санкт-Петербург, поселок
Песочный, Ленинградская ул., д. 68А.
ORCID: 0000-0002-7887-4635.
В.В. Клименко¹
Младший научный сотрудник.
ORCID: 0000-0002-6234-0604.
Ан.А. Богданов¹
Научный сотрудник.
ORCID: 0000-0002-0824-6633.
В.С. Бурдаков¹
Научный сотрудник.
Н.А. Верлов¹
Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник.
В.М. Моисеенко¹
Член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор,
директор ГБУЗ «СПбКНЦСВМП(о)
им. Н.П. Напалкова».
ORCID: 0000-0003-4807-7915.
М.В. Дубина²
Академик РАН, доктор медицинских
наук, главный ученый секретарь
президиума РАН ФГБУ
«Российская академия наук»,
119991, Москва, Ленинский пр., 14.
ORCID: 0000-0002-6606-3309

A.A. Bogdanov¹
PhD, Deputy director for science, Napalkov
Saint Petersburg Clinical Research and
Practical Center of Specialized Types
of Medical Care (Oncological),
Saint Petersburg, Russia,
197758, Saint Petersburg, Pesochny,
Leningradskaya str., 68A.
ORCID: 0000-0002-7887-4635.
V.V. Klimentko¹
Junior researcher.
ORCID: 0000-0002-6234-0604.
An.A. Bogdanov¹
Researcher.
ORCID: 0000-0002-0824-6633.
V.S. Burdakov¹
Researcher.
N.A. Verlov¹
PhD, Leading researcher.
V.M. Moiseyenko¹
Corresponding Member, Russian Academy of
Sciences, Professor, DSc, PhD, MD, Director,
Napalkov Saint Petersburg Clinical Research
and Practical Center of Specialized Types of
Medical Care (Oncological).
ORCID: 0000-0003-4807-7915.
M.V. Dubina²
Academician, Russian Academy of Sciences,
DSc, PhD, MD, Chief Scientific Secretary of
the Presidium, Russian Academy of Sciences,
119991, Moscow, Leninsky ave., 14.
ORCID: 0000-0002-6606-3309.

Повышенная реакционная способность делает синглетный кислород цитотоксическим агентом. Инфракрасное излучение 1273 нм позволяет осуществлять прямую фотогенерацию синглетного кислорода без использования фотосенсибилизатора. В настоящей работе мы продемонстрировали прямую фотогенерацию синглетного кислорода в водной среде лазерным излучением 1273 нм и на основе метода химических ловушек определили основные параметры генерации, в частности, коэффициент скорости генерации синглетного кислорода при плотности мощности излучения 1 мВт/см² и концентрации растворенного триплетно-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20050, <https://rscf.ru/project/22-25-20050/> и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с Соглашением от 15 апреля 2022 г. № 51/2022.

го кислорода 1 мкМ: $\xi = (4,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8} ((\text{с} \cdot \text{мВт}/\text{см}^2)^{-1})$. Мы показали, что облучение опухолевых клеток K562 и HeLa сфокусированным лазерным пучком 1273 нм и диаметром 100–1000 мкм достоверно приводит к цитотоксическому эффекту в зоне облучения, не вызванному термическим воздействием. Мы разработали математическую модель для расчета фотогенерируемых концентраций синглетного кислорода в водном окружении при облучении лазером 1273 нм и на основе экспериментальных данных рассчитали кумулятивные концентрации синглетного кислорода, приводящие к клеточной гибели: 50% – летальная доза для клеток HeLa ~1000 мкМ, K562 ~3000 мкМ. Результаты исследования, полученные нами, подтверждают перспективность применения лазерного излучения 1273 нм для прямой фотогенерации синглетного кислорода в тканях и терапии солидных опухолей.

Ключевые слова: ИК-излучение, синглетный кислород, прямая фотогенерация, цитотоксический эффект, опухолевые клетки.

Increased reactivity makes singlet oxygen a cytotoxic agent. Infrared radiation at 1273 nm allows for direct photogeneration of singlet oxygen without the use of a photosensitizer. In this study, we demonstrated direct photogeneration of singlet oxygen in an aqueous environment using laser radiation at 1273 nm. Using chemical trapping methods, we determined the key parameters of generation, including the generation rate coefficient of singlet oxygen at an irradiance of 1 mW/cm² and a concentration of dissolved triplet oxygen of 1 μM: $\xi = (4.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-8} ((\text{s} \cdot \text{mW}/\text{cm}^2)^{-1})$. We showed that irradiation of K562 and HeLa tumor cells with a focused laser beam at 1273 nm (diameter 100–1000 μm) leads to a significant cytotoxic effect in the irradiated area, not caused by thermal effects. We developed a mathematical model to calculate the photogenerated concentrations of singlet oxygen in an aqueous environment when irradiated with a 1273 nm laser. Based on experimental data, we calculated cumulative concentrations of singlet oxygen that result in cell death: 50% lethal dose for HeLa cells ~1000 μM, K562 cells ~3000 μM. Our research results confirm the potential application of 1273 nm laser radiation for direct photogeneration of singlet oxygen in tissues and the therapy of solid tumors.

Key words: infrared radiation, singlet oxygen, direct photogeneration, cytotoxic effect, tumor cells.

Введение

Молекулярный кислород, второй по распространенности газ в атмосфере Земли, играет решающую роль как в поддержании жизни, так и в уничтожении материалов [1]. В отсутствие кислорода, играющего ключевую роль в биоэнергетическом обмене и клеточной передаче сигналов, эволюция на нашей планете была бы другой [2, 3]. Неизвестно, являются ли старение и возрастные заболевания той ценой, которую мы платим за эволюционное сохранение и диверсификацию метаболических путей, использующих кислород и его активные формы, чтобы создавались более энергоэффективные, крупные и сложные виды [4]. Однако несомненен тот факт, что генерация активных форм кислорода (например, синглетного кислорода) является эффективным способом лечения бактериальных, вирусных заболеваний, а также злокачественных новообразований [5–7]. Передача энергии молекулярному кислороду в основном триплетном состоянии (³O₂) приводит к образованию синглетного молекулярного кислорода (¹O₂), являющегося сильным окислителем. Повышенная реакционная способность превращает ¹O₂ в цитотоксический агент [8], а возможность фотосенсибилизированного получения ¹O₂ сделала фотодинамическую терапию (ФДТ) эффективным инструментом в лечении солидных опухолей.

ФДТ основана на динамическом взаимодействии между фотосенсибилизатором (ФС), светом с определенной длиной волны и молекулярным кислородом, что приводит к разрушению опухолевых тканей [9]. ФДТ применяют в клинике для лечения рака уже более 40 лет. В 1978 г. Dougherty и соавт. показали, что внутривенное введение производных гематопорфирина

(HrD) – ФС, – позволяет эффективно производить абляцию кожных и подкожных опухолей, облучая их красным аргоновым лазером [10]. Впоследствии ФДТ была одобрена регулирующими органами по всему миру для лечения нескольких онкологических заболеваний. При этом количество показаний, включающих как поражения кожи, так и солидные опухоли, неуклонно увеличивается [11, 12]. Важным преимуществом использования ФДТ является возможность максимально избирательно контролировать место облучения (воздействия), так что мишенью является лишь место локализации опухоли, а здоровые ткани остаются практически незатронутыми [13]. Однако используемым ФС для возбуждения требуются лазеры красного диапазона (600–700 нм), что ограничивает эффективную глубину проникновения излучения в ткани до 5–7 мм [14]. Это приводит к ограничению применимости ФДТ при лечении крупных или глубоко расположенных опухолей [15]. Кроме того, следствием внутривенного введения ФС является световая гиперчувствительность, ограничивающая активность пациента и требующая защиты кожи и глаз от воздействия солнечных лучей на период лечения [16].

Для преодоления данных недостатков представляется привлекательной идея прямой фотогенерации ¹O₂ в опухоли без использования ФС – например, инфракрасным (ИК) лазерным излучением (в окне прозрачности для биологической ткани в диапазоне длин волн 700–1300 нм), имеющим по сравнению с красным на порядок большую глубину проникновения в ткани [17]. Возможность прямой лазерной фотогенерации ¹O₂ в различных растворителях была

показана в ряде работ, а полученные спектры поглощения $^3\text{O}_2$ в ИК-области 700–1300 нм позволили выявить специфические длины волн (765 нм, 1064 и 1273 нм) для дальнейшего исследования генерации $^1\text{O}_2$ в биологических средах [18–21]. На сегодня уже были выполнены исследования, которые показали, что цитотоксический эффект такого лазерного излучения происходит непосредственно из-за образования и действия $^1\text{O}_2$ и активных форм кислорода, а не температурного воздействия из-за поглощения среды [22–24]. Однако возможность практического применения такого воздействия в клинике остается невыясненной и требует дальнейшего изучения. В настоящей работе нами была разработана математическая модель для расчета фотогенерируемых концентраций $^1\text{O}_2$ в водном окружении при облучении лазером 1273 нм, экспериментально получены параметры для данной модели и на опухолевых клеточных линиях исследован цитотоксический эффект облучения лазером 1273 нм.

Материалы и методы

Клеточные культуры

В исследовании использовали клетки человеческой эритролейкемии K562 и клетки рака шейки матки HeLa (Институт цитологии РАН, РФ). Клетки K562 культивировали в среде RPMI-1640, а клетки HeLa культивировали в среде DMEM (HyClone, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; HyClone, США) и 40 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) в инкубаторе с увлажненной средой и содержанием 5% CO_2 при 37°C.

Метод химических ловушек

Для определения эффективности образования $^1\text{O}_2$ в растворе при лазерном воздействии использовали метод химических ловушек [20]. Метод основан на реакции взаимодействия $^1\text{O}_2$ с химическими ловушками, способными быстро реагировать с $^1\text{O}_2$ и образовывать продукты, обнаруживаемые спектроскопическими методами. Водный раствор, содержащий 0,2 М додецилсульфата натрия (SDS; Sigma-Aldrich, США) и химическую ловушку 1,3-дифенилизобензофурана (DPBF; Sigma-Aldrich, США) в концентрации DPBF 58 мкМ был приготовлен в 10-мм кварцевой кювете объемом 1,5 мл. Раствор облучали волоконным лазером RLM-20W-1273 (IPG Photonics, НТО «ИРЭ-Полус», РФ) с длиной волны 1273 нм и спектральной шириной полосы 1 нм, максимальная мощность 20 Вт, в непрерывном режиме работы лазера. Измерение спектра поглощения раствора DPBF (максимум спектра – 414 нм) проводили каждые 10 мин на спектрофотометре Nanodrop 2000C (Thermo Fischer Scientific, США). Уменьшение поглощения соответствовало взаимодействию химической ловушки DPBF с $^1\text{O}_2$. Скорость образования $^1\text{O}_2$ была рассчитана с

использованием уравнений (1) – (3), учитывающих концентрацию ловушки DPBF, скорость гашения $^1\text{O}_2$ ловушкой DPBF и водой:

$$V_{\text{DPBF}}(t) = V_{1\text{O}_2}(t) \left(\frac{k_{\text{ox}}[\text{DPBF}]_t}{\tau_{\Delta}^{-1} + k_{\text{ox}}[\text{DPBF}]_t} \right), \quad (1)$$

$$\left(V_{\text{DPBF}}(t) = \frac{1}{\epsilon_{\text{DPBF}} l} \frac{\Delta A_{\text{DPBF}}(t)}{\Delta t} = - \frac{d[\text{DPBF}]_t}{dt} \right),$$

где V_{DPBF} (М/с) – скорость фотоокисления ловушки DPBF, A_{DPBF} (cm^{-1}) – поглощение ловушки DPBF в растворе на длине волны 414 нм, ϵ_{DPBF} ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) – молярный коэффициент экстинкции DPBF на длине волны 414 нм ($\epsilon_{\text{DPBF}} = 23500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l – длина оптического пути ($l = 1 \text{ cm}$), $[\text{DPBF}]_t$ (М) – концентрация ловушки DPBF в растворе в момент времени t ($[\text{DPBF}]_0 = 58 \text{ мкМ}$), $[^1\text{O}_2]$ – концентрация $^1\text{O}_2$ (М), k_{ox} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) – константа скорости реакции ловушки DPBF с $^1\text{O}_2$ ($k_{\text{ox}} = 2,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ в воде с 0,2М SDS [20]), τ_{Δ} – время жизни $^1\text{O}_2$ в растворе ($\tau_{\Delta} = 4,0 \pm 0,2 \text{ мкс}$ в воде с 0,2М SDS [20]) $V_{1\text{O}_2}$ (М/с) – скорость генерации $^1\text{O}_2$ при лазерном облучении.

Данный подход использован в приближении, когда время жизни синглетного кислорода (около 10 мкс) намного меньше времени экспериментальных наблюдений (минуты). В данном приближении стационарная концентрация $^1\text{O}_2$ в любой заданный момент времени t может быть рассчитана путем приравнивания скоростей его фотогенерации и его гашения в результате взаимодействия с растворителем ($1/\tau_{\Delta}$) и реакции с молекулами химической ловушки ($k_{\text{ox}} \cdot [\text{DPBF}]$) [25].

Значения линейной аппроксимации зависимости концентрации $^1\text{O}_2$ от времени использовали как скорость образования $^1\text{O}_2$ (мкМ/с) при заданной плотности мощности лазерного излучения на длине волны 1273 нм:

$$V_{1\text{O}_2} = \sigma_{1273} \cdot I \cdot [^3\text{O}_2], \quad (2)$$

$$I = I_{\text{irr}} \cdot K, \quad (4)$$

$$\sigma_{1273} = \frac{V_{1\text{O}_2}}{K \cdot I_{\text{irr}} \cdot [^3\text{O}_2]} \quad (3)$$

$$V_{1\text{O}_2} = \xi \cdot P \cdot [^3\text{O}_2] \quad (4)$$

$$\xi = \frac{V_{1\text{O}_2}}{P \cdot [^3\text{O}_2]} \quad (5),$$

где I_{irr} (фотонов/см²/сек) – плотность потока падающих фотонов, которая при плотности мощности 1000 мВт/см² и длине волны 1273 нм составляет около $6,46 \cdot 10^{21}$ фотонов/см²/сек, σ_{1273} (см²) – сечение поглощения кислорода на длине волны лазерного излучения в данном растворителе, $[^3\text{O}_2]$ (М) – концентрация растворенного триплетного кислорода ($[^3\text{O}_2] = 0,290 \text{ мМ}$ в водном растворе 0,2М

SDS), K – коэффициент затухания потока фотонов 1273 нм из-за поглощения лазерного излучения растворителем ($K = (1 - e^{-\alpha L}) / \alpha L = 0,65$ в водном растворе 0,2 М SDS, $\alpha_{H_2O} = 1,09 \text{ см}^{-1}$, $L = 1 \text{ см}$ [26]), ξ ($(\text{с} \cdot \text{мВт/см}^2)^{-1}$) – коэффициент скорости образования $^1\text{O}_2$ при плотности мощности 1 мВт/см² и концентрации $^3\text{O}_2$ 1 мкМ, P (мВт/см²) – плотность мощности лазерного излучения 1273 нм.

Лазерное облучение клеточных культур

Облучение клеточных культур выполняли вышеуказанным лазером. Эксперименты проводили на клетках K562 и HeLa в чашках Петри диаметром 35 мм. Клетки рассеивали на чашки Петри при плотности $2,5 \cdot 10^5$ клеток/мл в 2 мл полной среды и культивировали в течение 24 часов в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2 . Перед облучением чашки Петри с клетками помещали в мини-инкубатор микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия), обеспечивающий аналогичные условия содержания при температуре 37°C и 5% CO_2 . Облучение клеток осуществляли с использованием оптической схемы микроскопа и дополнительного бокового ввода излучения. Для фокусировки лазерного излучения с длиной волны 1273 нм на поверхность клеточной культуры в чашке Петри применяли объектив EC Plan-Neofluar 10x/0,4 (Zeiss, Германия). Мощность лазерного излучения измеряли с помощью прибора Newport 841-PE Power Meter (Newport, США).

Определение выживаемости клеток

Оценку выживаемости клеток после облучения лазером 1273 нм выполняли флуоресцентным методом на вышеупомянутом микроскопе с использованием йодистого пропидия (PI, Invitrogen, США) в концентрации 10 мкг/мл. Для возбуждения флуоресценции применяли металлогалогенную лампу HXP 120W с каналом Rhod (возбуждающий фильтр 550/20 нм, диахроническое зеркало 585 нм, эмиссионный фильтр 630/40 нм). Для регистрации изображений клеток в проходящем свете и флуоресцентных изображений использовали высокочувствительную монохромную CCD-камеру AxioCam MRm (Zeiss, Германия). Определение гибели клеток производили на основе обнаружения положительного флуоресцентного сигнала красителя PI от клеток в области облучения. Выживаемость клеток выражалась в процентах как отношение количества живых клеток в зоне облучения к общему количеству клеток в зоне облучения. Данные о выживаемости клеток на графиках представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения, полученного в ходе трех независимых биологических экспериментов. Флуоресцентные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения AxioVision Rel. 4.9 (Zeiss, Германия). Расширение программы «Physiology» использовали для измерения флуоресцентного сигнала (среднее значение яркости пикселей в относительных

единицах) от клеток в области воздействия лазера и от клеток в контрольных областях без облучения. Результаты флуоресценции были представлены в виде среднего значения интенсивности флуоресценции с указанием стандартного отклонения.

Математическое моделирование генерации синглетного кислорода

Математическая модель генерации $^1\text{O}_2$ в опухолевых клетках при лазерном воздействии была разработана с использованием программного пакета MatLab 7.8. В качестве основы использовали полученную нами макроскопическую модель, описывающую генерацию $^1\text{O}_2$ при взаимодействии возбужденных молекул фотосенсибилизатора и $^3\text{O}_2$ [27, 28]. Вместо параметров фотосенсибилизированной генерации $^1\text{O}_2$ был установлен параметр, описывающий скорость прямой генерации $^1\text{O}_2$, измеренную методом химических ловушек. Модель описывает изменение концентраций $^1\text{O}_2$ и $^3\text{O}_2$ в единицу времени при заданной плотности мощности облучения, начальной концентрации $^3\text{O}_2$ и скорости поступления $^3\text{O}_2$ из окружающей среды и представляет собой систему дифференциальных уравнений (6) – (8):

$$\frac{d[^1\text{O}_2]}{dt} = \xi I(t) [^3\text{O}_2(t)], \quad (6)$$

$$\frac{d[^3\text{O}_2]}{dt} = -\xi I(t) [^3\text{O}_2(t)] + g \left(1 - \frac{[^3\text{O}_2(t)]}{[^3\text{O}_2(0)]} \right), \quad (7)$$

$$[^1\text{O}_2]_c = \int_0^t \xi I(t) [^3\text{O}_2] dt, \quad (8)$$

где $[^3\text{O}_2]$ (М) – концентрация $^3\text{O}_2$, $[^1\text{O}_2]$ (М) – концентрация $^1\text{O}_2$, $[^1\text{O}_2]_c$ (М) – кумулятивная концентрация $^1\text{O}_2$, ξ ($(\text{с} \cdot \text{мВт/см}^2)^{-1}$) – коэффициент скорости генерации $^1\text{O}_2$ при плотности мощности 1 мВт/см² и концентрации растворенного $^3\text{O}_2$ 1 мкМ, g (М/с) – максимальный приток $^3\text{O}_2$ в системе, $g = 20 \text{ мкМ/с}$ [29], I (Вт/см²) – интенсивность лазерного излучения.

При моделировании начальную концентрацию $^3\text{O}_2$ в клеточной среде $[^3\text{O}_2]_0$ принимали за 194 мкМ у поверхности среды и 150 мкМ в области клеточного монослоя при толщине слоя среды 2 мм и при плотности клеток 100 000 клеток/см² [30, 31].

Результаты

Генерация синглетного кислорода лазерным облучением 1273 нм в воде

На рисунке 1(а) представлены изменения в спектре поглощения химической ловушки DPBF в водном растворе с 0,2 М SDS при облучении лазером 1273 нм с плотностью мощности 1 Вт/см². Из рисунка видно, что со временем наблюдается уменьшение интенсивности спектра, свидетельствующее об окислении ловушки. Временная зависимость увеличения концен-

трации окисленной ловушки DPBF и, соответственно, генерируемого $^1\text{O}_2$ представлены на рисунке 1(б).

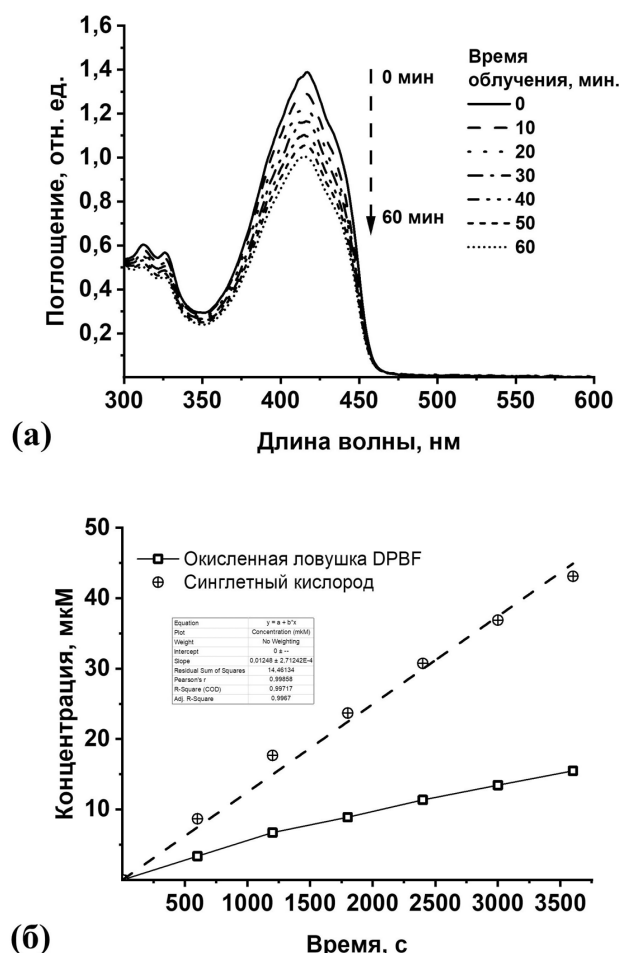


Рис. 1 – (а) Спектры поглощения химической ловушки 1,3-дифенилизобензофуран (DPBF) при окислении, (б) Временная зависимость концентрации синглетного кислорода и окисленной ловушки DPBF в воде при облучении лазером 1273 нм с плотностью мощности 1,0 Вт/см²

Используя уравнение (1), кумулятивную концентрацию $^1\text{O}_2$ определили путем деления скорости выгорания ловушки на показатель $k_{\text{ox}}[\text{DPBF}] / (\tau_{\Delta} + k_{\text{ox}}[\text{DPBF}])$ в каждой временной точке измерения (данное выражение характеризует долю $^1\text{O}_2$, провазимодействовавшего с ловушкой, с учетом времени жизни $^1\text{O}_2$ в растворе и константы скорости реакции k_{ox} между ловушкой и $^1\text{O}_2$). Линейная аппроксимация полученных величин позволила вычислить значение скорости генерации $^1\text{O}_2$ в воде $V_{102} = (1,248 \pm 0,027) \cdot 10^{-8} \text{ М/с}$ ($\sim 12,5 \text{ нМ/с}$) при облучении лазером 1273 нм с плотностью мощности 1000 мВт/см². С помощью уравнений (2) – (5) были получены значения сечения поглощения $^3\text{O}_2$ на длине волны 1273 нм $\sigma_{1273} = (1,166 \pm 0,025) \cdot 10^{-23} \text{ см}^2$ и параметр генерации $^1\text{O}_2$ при плотности мощности 1 мВт/см² и концентрации растворенного $^3\text{O}_2$ 1 мкМ: $\xi = (4,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8} ((\text{с} \cdot \text{мВт/см}^2)^{-1})$, который был использован далее для моделирования генерации $^1\text{O}_2$ при облучении клеточных линий.

Цитотоксический эффект лазерного излучения 1273 нм

Нами были проведены исследования цитотоксических эффектов облучения лазером 1273 нм суспензионных опухолевых клеток K562 и адгезионных опухолевых клеток HeLa при различных параметрах облучения.

На рисунке 2 представлены микрофотографии опухолевых клеток K562, облученных лазером 1273 нм в непрерывном режиме с плотностью мощности 200 Вт/см² (интенсивность лазерного пучка – 80 мВт, диаметр – 250 мкм) в течение 1 часа. Видно, что облучение опухолевых клеток оказывает цитотоксическое действие, приводящее к гибели клеток через 24 часа после окончания облучения (проникновение красителя PI в клетки и увеличение флуоресцентного сигнала).

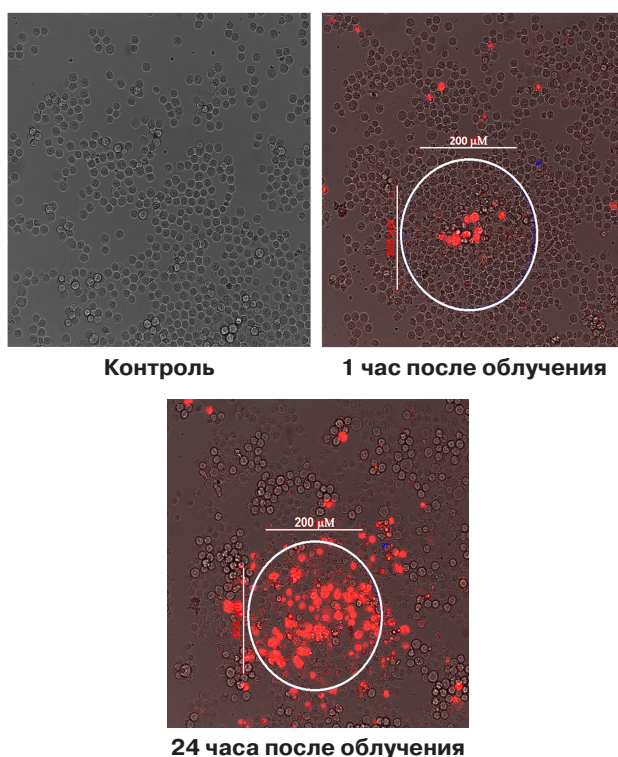
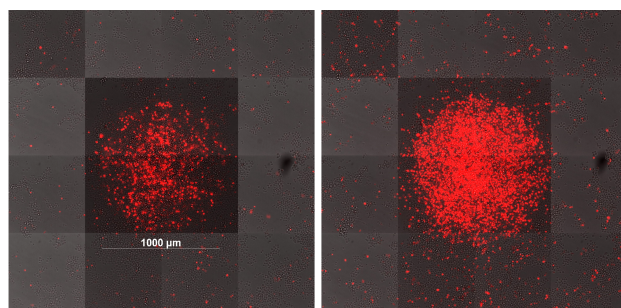


Рис. 2 – Микрофотографии опухолевых клеток K562 до облучения, через 1 час и через 24 часа после облучения лазером 1273 нм с плотностью мощности 200 Вт/см² в течение 1 часа. Мощность лазера на выходе объектива 100 мВт. Площадь облучения 0,00049 см² (диаметр 250 мкм). Доза облучения 720 000 Дж/см². Красная флуоресценция – проникновение красителя PI в погибшие клетки

На рисунке 3 представлены микрофотографии опухолевых клеток K562, облученных лазером 1273 нм в непрерывном режиме с плотностью мощности 10 Вт/см² (интенсивность лазерного пучка – 100 мВт, диаметр – 1100 мкм) в течение 24 часов. Видно, что такое облучение оказывает цитотоксическое действие, зафиксированное сразу после окончания облучения, и еще более ярко выраженное через 24 часа после облучения (проникновение красителя PI в клетки и увеличение флуоресцентного сигнала).

Непосредственно
после облучения

3 часа после облучения

Рис. 3 – Микрофотографии опухолевых клеток K562 непосредственно после облучения и через 24 часа после облучения лазером 1273 нм с плотностью мощности 10 Вт/см² в течение 24 часов. Мощность лазера на выходе объектива 100 мВт. Площадь облучения 0,0095 см² (диаметр 1100 мкм). Доза облучения 864 000 Дж/см². Красная флуоресценция – проникновение красителя PI в погибшие клетки

На рисунке 4 представлены временные зависимости накопления флуоресцентного сигнала PI от погибших клеток K562 для указанных выше условий облучения лазером 1273 нм (доза 720 кДж/см² для плотности мощности облучения 200 Вт/см², доза 864 кДж/см² для плотности мощности облучения 10 Вт/см²). Зависимость демонстрирует отсроченное развитие процесса гибели клеток после облучения. Падение флуоресцентного сигнала через ~12 часов в случае облучения с плотностью мощности 200 Вт/см², вероятно, обусловлено разрушением клеток и выходом окрашенных нуклеиновых кислот в среду.

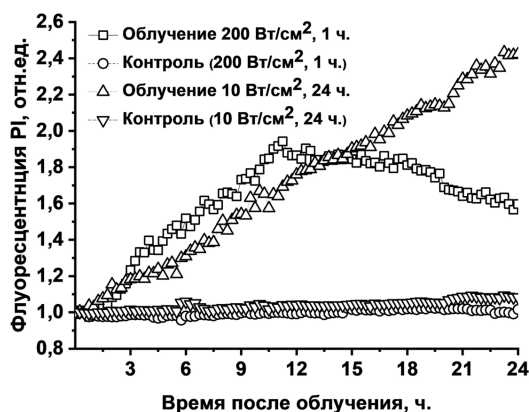
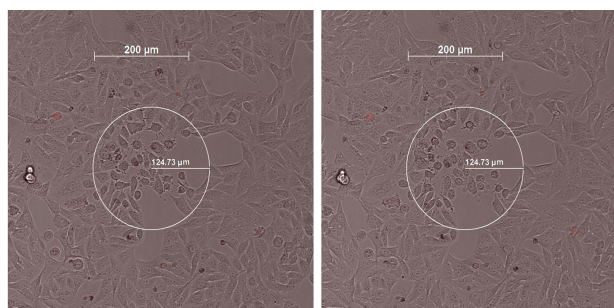
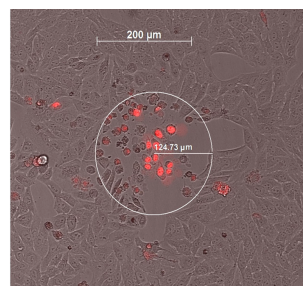


Рис. 4 – Временные зависимости флуоресцентного сигнала красителя PI от клеток K562 после окончания облучения лазером 1273 нм для двух режимов: 200 Вт/см² в течение 1 часа и 10 Вт/см² в течение 24 часов

На рисунке 5 представлены микрофотографии опухолевых клеток HeLa, облученных лазером 1273 нм в непрерывном режиме с плотностью мощности 180 Вт/см² (интенсивность лазерного пучка – 90 мВт, диаметр – 250 мкм) в течение 1 часа. Зафиксирована гибель клеток через 24 часа после окончания облучения. При этом непосредственно после окончания воздействия наблюдается уменьшение адгезии клеток к поверхности.

Непосредственно
после облучения

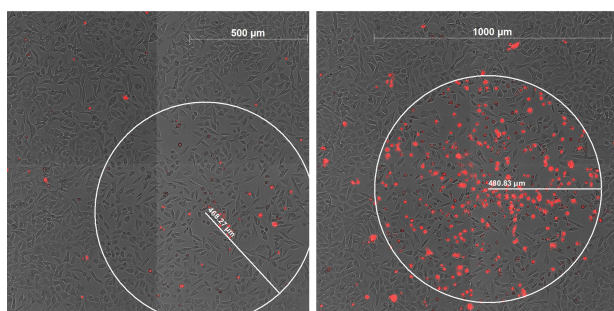
3 часа после облучения



24 часа после облучения

Рис. 5 – Микрофотографии опухолевых клеток HeLa непосредственно после облучения, через 3 часа и через 24 часа после облучения лазером 1273 нм с плотностью мощности 180 Вт/см² в течение 1 часа. Мощность лазера на выходе объектива 90 мВт. Площадь облучения 0,00049 см² (диаметр 250 мкм). Доза облучения 648 000 Дж/см². Красная флуоресценция – проникновение красителя PI в погибшие клетки

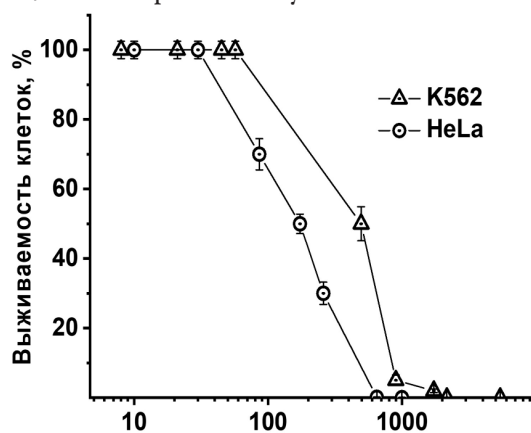
На рисунке 6 представлены микрофотографии опухолевых клеток HeLa, облученных лазером 1273 нм в непрерывном режиме с плотностью мощности 12 Вт/см² (интенсивность лазерного пучка – 90 мВт, диаметр – 960 мкм) в течение 6 часов. Видно, что непосредственно после облучения процент погибших клеток невелик, а существенная гибель клеток зафиксирована через 24 часа после окончания облучения.

Непосредственно
после облучения

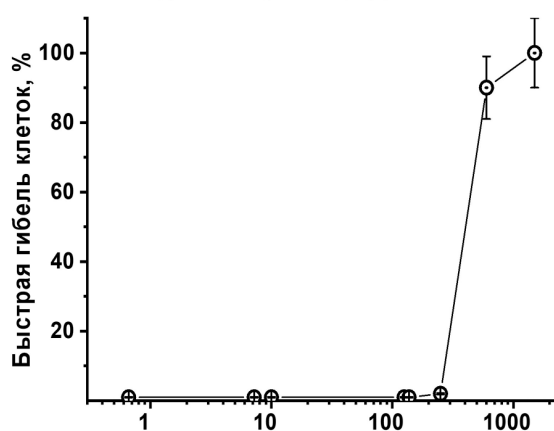
24 часа после облучения

Рис. 6 – Микрофотографии опухолевых клеток HeLa непосредственно после облучения и через 24 часа после облучения лазером 1273 нм с плотностью мощности 12 Вт/см² в течение 6 часов. Мощность лазера на выходе объектива 90 мВт. Площадь облучения 0,0072 см² (диаметр 960 мкм). Доза облучения 259 200 Дж/см². Красная флуоресценция – проникновение красителя PI в погибшие клетки

На рисунке 7(а) представлены зависимости выживаемости клеток K562 и HeLa от дозы облучения лазером 1273 нм при плотности мощности 100 Вт/см² и сфокусированном пучке диаметром 250 мкм, определенные через 24 часа после облучения. Из рисунка видно, что клетки HeLa более чувствительны к воздействию и 50% летальная доза (доза, при которой гибнут 50% клеток) для них составляет около 200 кДж/см², в то время как для клеток K562 – порядка 500 кДж/см². Поскольку измерение температуры в месте фокусировки лазерного пучка – задача затруднительная, на опухолевых клетках HeLa нами было выполнено исследование зависимости «быстрой» гибели клеток (гибель клеток фиксировали непосредственно после окончания облучения) от плотности мощности облучения 1273 нм при сфокусированном пучке 250 мкм и времени облучения 1 час.



(а) Доза облучения, кДж/см²



(б) Плотность мощности, Вт/см²

Рис. 7 – (а) Зависимость выживаемости клеток K562 и HeLa от дозы облучения лазером 1273 нм, сфокусированным пучком диаметром 250 мкм при плотности мощности 100 Вт/см². (б) Зависимость быстрой некротической гибели клеток от плотности мощности 0,5–1500 Вт/см² при сфокусированном пучке диаметром 250 мкм

Ранее в ряде работ (например, [32]) было показано, что выживаемость клеток HeLa непосредственно после инкубации в течение 1 часа при температуре 43°C составляет около 20%. Таким образом, при достижении

указанной летальной температуры можно ожидать значительного числа умерших клеток, окрашенных красителем PI. Результаты исследования представлены на рисунке 7(б). Видно, что в условиях нашего эксперимента «быстрая» гибель клеток происходит при плотностях мощности выше 250 Вт/см². Вместе с результатами, изложенными ранее, это свидетельствует о том, что основная гибель опухолевых клеток при воздействии лазерным излучением 1273 нм происходит отсроченно, она не связана с достижением биокритических температур, а является следствием генерации ¹O₂ внутри клеток и в среде.

Моделирование прямой генерации синглетного кислорода и расчет цитотоксических доз

Кумулятивные концентрации ¹O₂, образующиеся под воздействием лазерного излучения 1273 нм сфокусированным пучком диаметром 250 мкм и плотностью мощности 100 мВт/см² при достижении доз облучения, указанных на рисунке 7(а), были рассчитаны численным моделированием уравнений (6) – (8), используя параметры скорости генерации синглетного кислорода (ξ) в водном растворе, полученные экспериментально. На рисунке 8 представлена зависимость выживаемости клеток в поле облучения от рассчитанной концентрации ¹O₂. Рассчитанные концентрации ¹O₂ позволили определить пороговые уровни цитотоксического воздействия. В случае опухолевых клеток HeLa 50%-летальная доза синглетного кислорода составила порядка 1000 мкМ, в то время как для клеток K562 она составила около 3000 мкМ.

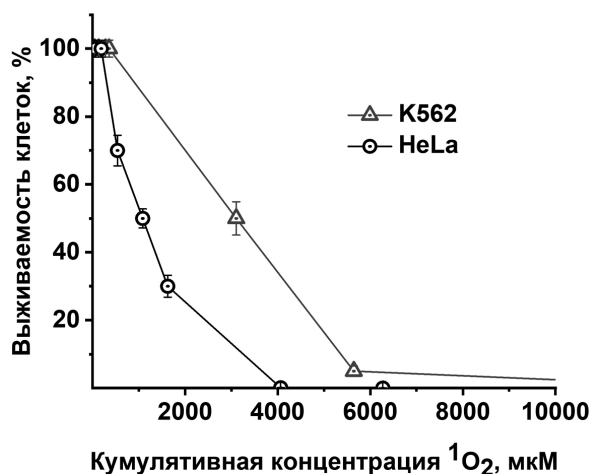


Рис. 8 – Зависимость выживаемости клеток K562 и HeLa от рассчитанной кумулятивной концентрации синглетного кислорода, образовавшегося при облучении лазером 1273 нм сфокусированным пучком диаметром 250 мкм и плотностью мощности 100 мВт/см² при достижении доз облучения, указанных на рисунке 7(а)

Обсуждение

Используя метод химических ловушек, мы получили основные параметры для процесса прямой фотогенерации ¹O₂ в водной среде лазерным излучением

1273 нм. В условиях проведенных экспериментов вычисленные значения скорости генерации $^1\text{O}_2$ для плотности мощности 1 Вт/см² составили ~12,5 нМ/с. Ранее, в работе [20], для фотодиодного источника 1270 нм с шириной пропускания 12 нм и плотностью мощности 1 Вт/см² было получено близкое значение скорости генерации $^1\text{O}_2$ – 3,9 нМ/с. Сравнение скорости прямой фотогенерации $^1\text{O}_2$ с возможными скоростями генерации $^1\text{O}_2$ при фотодинамическом воздействии (например, 4200 нМ/с для ФС на основе хлорина еб при облучении лазером 662 нм с плотностью мощности 10 мВт/см², [33]) говорит о несомненном преимуществе ФДТ в аспекте затрат времени на облучение, необходимое для достижения цитотоксических доз $^1\text{O}_2$ – минуты против десятков часов.

Однако недостатки ФДТ, включая гетерогенное накопление ФС в опухоли, выгорание ФС во время облучения, световую токсичность, малую глубину проникновения в ткань используемого лазерного излучения по сравнению с излучением 1273 нм, делают метод прямой фотогенерации $^1\text{O}_2$ перспективным для исследования и внедрения в клиническую практику [17].

Нами было показано, что лазерное излучение 1273 нм, сфокусированное в узкий пучок диаметром 250–1000 мкм, приводит к цитотоксическому эффекту – отсроченной гибели опухолевых клеток K562 и HeLa в зоне облучения. Ранее в работе [24] провели исследование влияния ИК-излучения в диапазоне длин волн 1200–1300 нм на опухолевые клетки рака молочной железы MCF-7, используя сфокусированное лазерное излучение для минимизации теплового эффекта. Было показано, что длина волны 1273 нм соответствует максимальному цитотоксическому эффекту. Для опухолевых клеток MCF-7 авторы впервые определили пороговую дозу 360 кДж/см² при длине волны 1273 нм, которая приводила к 100% клеточной гибели. При этом та же доза излучения при длине волны 1300 нм не вызывала цитотоксического эффекта.

В нашей работе (рисунок 7(а)) также были определены пороговые дозы для 100 % гибели опухолевых клеток: в случае HeLa ~700 кДж/см², K562 – ~1100 кДж/см². Также используемый подход сфокусированного лазерного пучка, по аналогии с работой [24], позволил избежать тепловых эффектов из-за поглощения водой ИК-излучения лазера, о чем свидетельствовала отсроченная гибель клеток. В частности, для клеток HeLa и лазерного пучка диаметром 250 мкм была показана возможность использования плотностей мощности излучения до 250 Дж/см², не приводящая к «быстрой» термической гибели клеток. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксический эффект происходит в результате прямой фотогенерации $^1\text{O}_2$ излучением. Отметим, что в одной из недавних работ [34] было продемонстрировано, что воздействие лазерным излучением на длине волны 1267 нм в дозе 200 Дж/см² на одиночные

клетки меланомы B16 приводит к образованию в них синглетного кислорода и вызывает апоптотическую гибель. В связанной работе [35] компьютерная симуляция теплового воздействия используемого режима лазера показала, что для него не происходит значимого нагрева культуральной среды. Используя численные методы и экспериментально определенные параметры, мы рассчитали кумулятивные концентрации $^1\text{O}_2$, образующиеся под воздействием лазерного излучения 1273 нм в условиях наших экспериментов, что позволило определить пороговые дозы кумулятивной концентрации $^1\text{O}_2$, приводящие к тотальной гибели опухолевых клеток: в случае HeLa ~4000 мкМ, K562 – ~10200 мкМ (рис. 8).

Результаты исследования, полученные нами, подтверждают перспективность применения лазерной терапии с использованием длины волны 1273 нм для прямой фотогенерации $^1\text{O}_2$ в ткани и терапии солидных опухолей. Нами продемонстрирована возможность нетермического цитотоксического воздействия лазерного излучения 1273 нм на опухолевые клетки. Однако в нашем исследовании площадь облучаемой поверхности не превышала диаметра 1 мм. Такая площадь облучения недостаточна для возможной эффективной трансляции метода в клиническую практику. Кроме того, тепловые эффекты за счет высокого поглощения излучения 1273 нм молекулами воды при переходе от клеточного образца (клетки на поверхности в водной среде) к живой ткани будут намного более значительны в результате иной термокомпенсации и рассеяния. Перспективным направлением развития данного подхода может быть использование импульсных режимов лазерного облучения по аналогии с разработанными режимами для стандартной ФДТ опухолей [28], когда тепловая релаксация будет происходить в промежутке между импульсами облучения. Необходимо разработать модель и провести расчеты параметров воздействия импульсно-периодического облучения 1273 нм на живую ткань, которые не приводили бы к разогреву до биокритических температур, а также провести дополнительные экспериментальные исследования. Это откроет возможность широкого практического применения прямой фотогенерации $^1\text{O}_2$ в онкологии.

Заключение

В настоящей работе мы продемонстрировали прямую фотогенерацию синглетного кислорода в водной среде лазерным излучением 1273 нм и определили основные параметры генерации. Было показано, что облучение сфокусированным лазерным пучком 1273 нм опухолевых клеток K562 и HeLa приводит к цитотоксическому эффекту в зоне облучения, не вызванному термическим воздействием, и определены пороговые дозы облучения в условиях эксперимента. Была разработана математическая модель для расчета фотогенерируемых концентраций $^1\text{O}_2$ в водном

окружении при облучении лазером 1273 нм и рассчитаны цитотоксические кумулятивные концентрации $^1\text{O}_2$, приводящие к клеточной гибели. Полученные результаты можно рассматривать как необходимую

основу для дальнейшего исследования метода прямой фотогенерации $^1\text{O}_2$ ИК-излучением в клеточных культурах и тканях с целью разработки нового метода фототерапии солидных опухолей.

Используемые сокращения:

$^1\text{O}_2$ – синглетный кислород;
 $^3\text{O}_2$ – триплетный кислород;
 DPIBF – 1,3-дифенилизобензофуран;
 HpD – производные гематопорфирина;

SDS – додецилсульфат натрия;
 АФК – активные формы кислорода;
 ИК – инфракрасный;
 ФДТ – фотодинамическая терапия;
 ФС – фотосенсибилизатор.

Список литературы

1. Ogilby P.R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun // Chemical Society Reviews. – 2010. – Vol. 39, № 8. – P. 3181–3209.
2. Markbard A.L., McCoy J.G., To T.-L., Mootha V.K. A genetically encoded system for oxygen generation in living cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – Vol. 119, № 43. – P. e220795119.
3. Raymond J., Segrè D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life // Science. – 2006. – Vol. 311, № 5768. – P. 1764–7.
4. Thannickal V.J. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2009. – Vol. 40, № 5. – P. 507–10.
5. Maharjan P.S., Bhattarai H.K. Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death // Journal of Oncology. – 2022. – Vol. 2022. – P. 7211485.
6. Wysocki M., Czarzynska-Goslinska B., Ziental D., Michalak M., Güzel E., Sobotta L. Excited State and Reactive Oxygen Species against Cancer and Pathogens: A Review on Sonodynamic and Sono-Photodynamic Therapy // ChemMedChem. – 2022. – Vol. 17, № 13. – P. e202200185.
7. Mfouo-Tynga I.S., Mouinga-Ondeme A.G. Photodynamic Therapy: A Prospective Therapeutic Approach for Viral Infections and Induced Neoplasia // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15, № 10. – P. 1273.
8. Schiff L.J., Eisenberg W.C., Dziuba J., Taylor K., Moore S.J. Cytotoxic effects of singlet oxygen // Environmental Health Perspectives. – 1987. – Vol. 76. – P. 199–203.
9. Dolmans D.E. J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // Nature Reviews Cancer. – 2003. – Vol. 3, № 5. – P. 380–387.
10. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weisbaup K.R., Boyle D., Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors // Cancer Res. – 1978. – Vol. 38, № 8. – P. 2628–35.
11. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update // CA Cancer J Clin. – 2011. – Vol. 61, № 4. – P. 250–81.
12. dos Santos A.F., de Almeida D.R.Q., Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review // Journal of Cancer Metastasis and Treatment. – 2019. – Vol. 5. – P. 25.
13. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions // Pharmaceuticals. – 2021. – Vol. 13, № 9.
14. Kim M.M., Darafsheh A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy // Photochemistry and Photobiology. – 2020. – Vol. 96, № 2. – P. 280–294.
15. Burgess D.J. Tissue penetration of photodynamic therapy // Nature Reviews Cancer. – 2012. – Vol. 12, № 11. – P. 737–737.
16. Borgia F., Giuffrida R., Caradonna E., Vaccaro M., Guarneri F., Cannavò S.P. Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy // Biomedicines. – 2018. – Vol. 6, № 1.
17. Богданов А., Клименко В., Богданов А.А., Верлов Н., Моисеенко В. Прямая фотогенерация синглетного кислорода в биологических средах для терапии рака // Практическая онкология. – 2023. – Т. 24, № 1. – С. 39–47.
18. Blázquez-Castro A. Direct (1)O(2) optical excitation: A tool for redox biology // Redox Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 39–59.
19. Jockusch S., Turro N.J., Thompson E.K., Gouterman M., Callis J.B., Khalil G.E. Singlet molecular oxygen by direct excitation // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. 235–239.
20. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S., Roumbal Y.V. Photochemical investigation of the IR absorption bands of molecular oxygen in organic and aqueous environment // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2012. – Vol. 11, № 6. – P. 988–997.
21. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S. Photonics of dissolved oxygen molecules. Comparison of the rates of direct and photosensitized excitation of oxygen and reevaluation of the oxygen absorption coefficients // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2016. – Vol. 329. – P. 167–174.

22. Sokolovski S.G., Zolotovskaya S.A., Goltsov A., Pourreyron C., South A.P., Rafailov E.U. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells // Scientific Reports. – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 3484.
23. Saenko Y.V., Glushchenko E.S., Zolotovskii I.O., Sholokhov E., Kurkov A. Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm // Lasers Med Sci. – 2016. – Vol. 31, № 3. – P. 405–13.
24. Anquez F., El Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen // Photochem Photobiol. – 2012. – Vol. 88, № 1. – P. 167–74.
25. Entradas T., Waldron S., Volk M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2020. – Vol. 204. – P. 111787.
26. Sivéry A., Barras A., Boukberroub R., Pierlot C., Aubry J.M., Anquez F., Courtade E. Production Rate and Reactivity of Singlet Oxygen $^1O_2(^1\Delta_g)$ Directly Photoactivated at 1270 nm in Lipid Nanocapsules Dispersed in Water // The Journal of Physical Chemistry C. – 2014. – Vol. 118, № 5. – P. 2885–2893.
27. Klimenko V.V., Bogdanov A.A., Knyazev N.A., Dubina M.V. Pulse mode irradiation at Radachlorin PDT shifted cell death to apoptosis in vitro // Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VII / Под ред. Lilge L., Sroka R. – Vol. 9542: SPIE Proceedings – Munich: Optica Publishing Group, 2015. – P. 95421D.
28. Klimenko V.V., Knyazev N.A., Moiseenko F.V., Rusanov A.A., Bogdanov A.A., Dubina M.V. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2016. – Vol. 13. – P. 101–107.
29. Wang K.K., Finlay J.C., Busch T.M., Hahn S.M., Zhu T.C. Explicit dosimetry for photodynamic therapy: macroscopic singlet oxygen modeling // J Biophotonics. – 2010. – Vol. 3, № 5–6. – P. 304–18.
30. Ibanez J.G., Hernandez-Esparza M., Doria-Serrano C., Fregoso-Infante A., Singh M.M. Dissolved Oxygen in Water // Environmental Chemistry: Microscale Laboratory Experiments / Ibanez J. G. и др. – New York, NY: Springer New York, 2008. – P. 16–27.
31. Place T.L., Domann F.E., Case A.J. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research // Free Radic Biol Med. – 2017. – Vol. 113. – P. 311–322.
32. Bettaieb A., Averill-Bates D.A. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C protects cells against heat shock-induced apoptosis // Journal of Cellular Physiology. – 2005. – Vol. 205, № 1. – P. 47–57.
33. Klimenko V.V., Kaydanov N.E., Emelyanov A.K., Bogdanov A.A. ssDNA damage dependence from singlet oxygen concentration at photodynamic interaction // Journal of Physics: Conference Series. – 2017. – Vol. 917, № 4. – P. 042013.
34. Novikova I.N., Potapova E.V., Dremín V.V., Dunaev A.V., Abramov A.Y. Laser-induced singlet oxygen selectively triggers oscillatory mitochondrial permeability transition and apoptosis in melanoma cell lines // Life Sciences. – 2022. – Vol. 304. – P. 120720.
35. Dremín V., Novikova I., Rafailov E. Simulation of thermal field distribution in biological tissue and cell culture media irradiated with infrared wavelengths // Optics Express. – 2022. – Vol. 30, № 13. – P. 23078–23089.

References

1. Ogilby P.R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. Chemical Society Reviews. 2010; 39(8): 3181–209.
22. Markhard A.L., McCoy J.G., To T.-L., Mootha V.K. A genetically encoded system for oxygen generation in living cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022; 119(43): e2207955119.
3. Raymond J., Segrè D. The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. Science. 2006; 311(5768): 1764–7.
4. Thannickal V.J. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009; 40(5): 507–10.
5. Mabrarjan P.S., Bhattarai H.K. Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. Journal of Oncology. 2022; 2022: 7211485.
6. Wysocki M., Czarczynska-Goslinska B., Ziental D., Michalak M., Güzel E., Sobotta L. Excited State and Reactive Oxygen Species against Cancer and Pathogens: A Review on Sonodynamic and Sono-Photodynamic Therapy. ChemMedChem. 2022; 17(13): e202200185.
7. Mfouo-Tynga I.S., Mouinga-Ondeme A.G. Photodynamic Therapy: A Prospective Therapeutic Approach for Viral Infections and Induced Neoplasia. Pharmaceuticals. 2022; 15(10): 1273.
8. Schiff L.J., Eisenberg W.C., Dziuba J., Taylor K., Moore S.J. Cytotoxic effects of singlet oxygen. Environmental Health Perspectives. 1987; 76: 199–203.
9. Dolmans D.E. J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer. Nature Reviews Cancer. 2003; 3(5): 380–7.
10. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weisshaupt K.R., Boyle D., Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. 1978; 38(8): 2628–35.
11. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin. 2011; 61(4): 250–81.
12. dos Santos A.F., de Almeida D.R.Q., Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review. Journal of Cancer Metastasis and Treatment. 2019; 5: 25.
13. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. Pharmaceutics. 2021; 13(9).

114. Kim M.M., Darafsheb A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*. 2020;96(2):280-94.
15. Burgess D.J. Tissue penetration of photodynamic therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(11):737.
16. Borgia F., Giuffrida R., Caradonna E., Vaccaro M., Guarneri F., Cannavò S.P. Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy. *Biomedicine*. 2018; 6(1).
17. [Bogdanov A.A., Klimenko V.V., Bogdanov A.A., Verlov N.F., Moiseyenko V.M. Direct photogeneration of singlet oxygen in biological medium for cancer therapy. *Practical oncology*. 2023; 24(1): 39-47. (In Russ.)].
18. Blázquez-Castro A. Direct (1)O(2) optical excitation: A tool for redox biology. *Redox Biol*. 2017; 13: 39-59.
19. Jockusch S., Turro N.J., Thompson E.K., Gouterman M., Callis J.B., Khalil G.E. Singlet molecular oxygen by direct excitation. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2008; 7(2): 235-9.
20. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S., Roumbal Y.V. Photochemical investigation of the IR absorption bands of molecular oxygen in organic and aqueous environment. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2012; 11(6): 988-97.
21. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S. Photonics of dissolved oxygen molecules. Comparison of the rates of direct and photosensitized excitation of oxygen and reevaluation of the oxygen absorption coefficients. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016; 329: 167-74.
22. Sokolovski S.G., Zolotovskaya S.A., Goltsov A., Pourreyaon C., South A.P., Rafailov E.U. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Scientific Reports*. 2013; 3(1): 3484.
23. Saenko Y.V., Glushchenko E.S., Zolotovskii I.O., Sholokhov E., Kurkov A. Mitochondrial dependent oxidative stress in cell culture induced by laser radiation at 1265 nm. *Lasers Med Sci*. 2016; 31(3): 405-13.
24. Anquez F., El Yazidi-Belkoura I., Randoux S., Suret P., Courtade E. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 2012; 88(1): 167-74.
25. Entradas T., Waldron S., Volk M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2020; 204: 111787.
26. Sivéry A., Barras A., Boukherroub R., Pierlot C., Aubry J.M., Anquez F., et al. Production Rate and Reactivity of Singlet Oxygen $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ Directly Photoactivated at 1270 nm in Lipid Nanocapsules Dispersed in Water. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2014; 118(5): 2885-93.
27. Klimenko V.V., Bogdanov A.A., Knyazev N.A., Dubina M.V., editors. Pulse mode irradiation at Radachlorin PDT shifted cell death to apoptosis in vitro. *Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VII*; 2015 2015/06/21; Munich: Optica Publishing Group.
28. Klimenko V.V., Knyazev N.A., Moiseenko F.V., Rusanov A.A., Bogdanov A.A., Dubina M.V. Pulse mode of laser photodynamic treatment induced cell apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016; 13: 101-7.
29. Wang K.K., Finlay J.C., Busch T.M., Hahn S.M., Zhu T.C. Explicit dosimetry for photodynamic therapy: macroscopic singlet oxygen modeling. *J Biophotonics*. 2010; 3(5-6): 304-18.
30. Ibanez J.G., Hernandez-Esparza M., Doria-Serrano C., Fregoso-Infante A., Singh M.M. Dissolved Oxygen in Water. In: Ibanez J.G., Hernandez-Esparza M., Doria-Serrano C., Fregoso-Infante A., Singh M.M., editors. *Environmental Chemistry: Microscale Laboratory Experiments*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 16-27.
31. Place T.L., Domann F.E., Case A.J. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med*. 2017; 113: 311-22.
32. Bettaieb A., Averill-Bates D.A. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. 2005; 205(1): 47-57.
33. Klimenko V.V., Kaydanov N.E., Emelyanov A.K., Bogdanov A.A. ssDNA damage dependence from singlet oxygen concentration at photodynamic interaction. *Journal of Physics: Conference Series*. 2017; 917(4): 042013.
34. Novikova I.N., Potapova E.V., Dremín V.V., Dunaev A.V., Abramov A.Y. Laser-induced singlet oxygen selectively triggers oscillatory mitochondrial permeability transition and apoptosis in melanoma cell lines. *Life Sciences*. 2022; 304: 120720.
35. Dremín V., Novikova I., Rafailov E. Simulation of thermal field distribution in biological tissue and cell culture media irradiated with infrared wavelengths. *Opt Express*. 2022; 30(13): 23078-89.