

УДК 616.31-039.57

**А.В. Антонова, Е.С. Глущенко, И.О. Золотовский,
А.С. Курков, Ю.В. Саенко, В.В. Светухин**

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ
ВКР-ЛАЗЕРОМ С РАБОЧЕЙ ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 1265 НМ
РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ HELA**

Исследуются динамика развития оксидативного стресса, повреждения ДНК, изменения митохондриального потенциала и митохондриальной массы при облучении культуры раковых клеток линии HELA ВКР-лазером с длиной волны излучения 1265 нм. Показано, что облучение раковых клеток линии HELA ВКР-лазером с рабочей длиной волны 1265 нм индуцирует клеточную смертность через увеличение концентрации внутриклеточных активных форм кислорода, увеличение повреждения ДНК, снижение митохондриального потенциала и митохондриальной массы.

Ключевые слова: волоконный ВКР-лазер, оксидативный стресс, повреждение ДНК, митохондриальный потенциал, митохондриальная масса.

**A.V. Antonova, E.S. Glushchenko, I.O. Zolotovskii,
A.S. Kurkov, Iu.V. Saenko, V.V. Svetukhin**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

**STUDY OF THE MECHANISMS OF INTRACELLULAR
OXIDATIVE STRESS INITIATED BY RAMAN LASER
IN CANCER CELLS OF HELA LINE
AT THE WAVELENGTH OF 1265 NM**

The dynamics of oxidative stress, DNA damage, changes in mitochondrial potential and mitochondrial mass are studied with the cancer cells of HELA line irradiated by a Raman laser at the wavelength of 1265 nm. It is demonstrated that Raman laser irradiation at this wavelength induces cell death causing an increase of the concentration of intracellular reactive oxygen species, an increase of DNA damage, and a decrease of mitochondrial potential and mitochondrial mass.

Keywords: Raman fiber lasers, oxidative stress, DNA damage, mitochondrial potential, mitochondrial mass.

1. Введение

В настоящее время наблюдается широкое применение лазерных технологий для лечения опухолевых заболеваний. Фотодинамическая терапия (ФДТ) является терапевтической процедурой, которая оказывает селективное цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Она состоит из трех нетоксичных компонентов – света, фотосенсибилизатора и кислорода. Совместное действие данных компонентов приводит к фотохимической реакции, продуктом которой является молекула с высокой химической активностью – синглетный кислород [1]. Широкое применение ФДТ обусловлено рядом ее преимуществ по сравнению с традиционными методами: низкая инвазивность, высокая избирательность и достаточно низкая токсичность фотосенсибилизаторов, непродолжительность сеансов лечения, возможность повторного проведения лечения без рисков развития осложнений [1]. Однако фотосенсибилизирующие препараты поглощаются не только опухолевыми, но и здоровыми тканями, что приводит к общей фотосенсибилизации организма и возникновению фотодерматитов. Также отмечается, что используемые в настоящее время фотосенсибилизаторы не способны создавать достаточно высокие концентрации в опухолевых тканях, а низкая проникающая способность применяемых лазеров и достаточно высокая стоимость процедуры в целом вызвала сильный интерес к созданию ФДТ без использования фотосенсибилизаторов [1, 2].

В настоящее время в литературе имеются данные о том, что излучение лазера с длиной волны 1262–1268 нм совпадает со спектром поглощения молекулярного кислорода, что переводит его в синглетный кислород. Предполагается, что синглетный кислород запускает в клетке каскад реакций, ведущих к дальнейшему образованию АФК и ее гибели в результате апоптоза или некроза [2–4]. Хотя синглетный кислород и является высокоактивным соединением, его возможности в непосредственной индукции внутриклеточного оксидативного стресса остаются под вопросом [5]. Повреждающее действие синглетного кислорода сильно зависит от места его генерации [6]. Синглетный кислород не может перемещаться на расстояния больше 0,02 мкм, что сопоставимо с размером белковой молекулы [7]. В отличие от других активных форм кислорода, синглетный кислород не может инициировать цепные радикальные реакции, так как не обладает лишним неспаренным электроном, и может вызывать только химическую модифика-

цию биомолекул. Следует также учитывать, что в клетках присутствуют в достаточно больших количествах эндогенные фотосенсибилизаторы – порфирины. В клетках порфирины представлены молекулами цитохромов. Порфирины обладают спектрами поглощения в диапазоне 400–900 нм, а также в инфракрасном диапазоне 1000–1550 нм [9].

Основное количество порфиринов в клетке входит в состав белков, локализованных в митохондриях. Митохондрии являются одним из основных внутриклеточных источников активных форм кислорода и могут быть причиной возникновения внутриклеточного оксидативного стресса [9]. Давление кислорода в митохондриях составляет 30–40 мм рт. ст. [10], тогда как в цитоплазме – 3–7 мм рт.ст. [11], что делает компоненты митохондрий весьма чувствительными к индукторам синглетного кислорода. Таким образом, можно предположить, что синглетный кислород, образовавшийся в результате облучения лазером 1262–1268 нм, может оказывать свое негативное воздействие на клетки опосредованно, через повреждение митохондрий.

В настоящем исследовании анализируется динамика развития оксидативного стресса, повреждения ДНК, изменения митохондриального потенциала и митохондриальной массы при облучении культуры раковых клеток линии HELA ВКР-лазером с длиной волны излучения 1265 нм с целью выяснения роли митохондрий в механизмах клеточной смерти.

2. Материал и методы исследования

В качестве источника излучения применялся ВКР-лазер с использованием двукратного рамановского излучения иттербиевого волоконного лазера с длиной волны 1125 мкм. В качестве среды преобразователя использовалось стандартное телекоммуникационное волокно. Максимальная непрерывная выходная мощность применяемого излучения составила около 4 Вт на длине волны (1265 ± 3) нм. Соответствующий спектр излучения представлен на рис. 1.

Плотность энергии лазерного излучения, поглощаемого биотканью (\mathcal{E} , Дж/см²), с учетом большей (по сравнению с глубиной проникновения лазерного излучения, составляющей на длине 1265 нм менее 1,5 мм) толщины облучаемой биоткани рассчитывалась из простейшего соотношения $\mathcal{E} = Pt/S$, где P – средняя мощность излучения, Вт, t – время облучения, с, S – площадь лазерного пятна на биоткани, см².

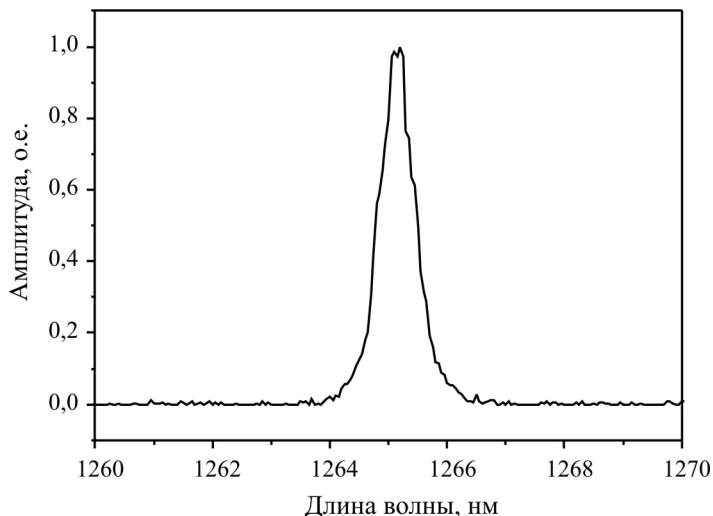


Рис. 1. Спектр излучения ВКР-лазера

В эксперименте использовали линию раковых клеток эндотелия матки – HELA. Для культивирования использовали среду DMEM/F12 без глутамин, содержащую 10 % FBS и гентамицин (концентрация 50 мкг/л). За сутки до облучения клетки трипсинизировали и пересаживали в 8-луночный культуральный планшет в концентрации $4 \cdot 10^4$ клеток/ячейку. В планшете культивировали клетки в тех же условиях.

Клетки облучали в инкубационной ячейке OkolabUno с поддержанием постоянной температуры 37 °С, влажности – 95 % и концентрации CO₂ – 5 % в течение 10 мин, при этом плотность дозы поглощенного излучения составляла приблизительно $(0,1 \pm 0,01)$ Дж/см². Сразу после облучения проводились измерения температуры среды в ячейке.

Внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода определяли с использованием 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA). DCFH-DA добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 30 мкМ и инкубировали 20 мин при 37 °С в CO₂-инкубаторе. После инкубации среду удаляли, добавляли равный объем свежей среды и оценивали интенсивность флуоресценции с использованием инвертированного микроскопа NikonTi-S (фильтр 480/529) и инкубационной ячейки OkolabUno [12].

Митохондриальный потенциал анализировали при помощи красителя тетрародомиперхлората – TMRE. TMRE добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 200 мкМ и инкубировали 20 мин при

37 °С в CO₂-инкубаторе. После инкубации среду удаляли, добавляли равный объем свежей среды и оценивали интенсивность флуоресценции с использованием инвертированного микроскопа NikonTi-S (фильтр 480/529) и инкубационной ячейки OkolabUno [13].

Митохондриальную массу анализировали через 6 ч после облучения с использованием флуоресцентного красителя 10-N-нонил акридинового оранжевого (NAO). NAO добавляли к клеткам в конечной концентрации 50 нМ, инкубировали 20 мин при 37 °С в CO₂-инкубаторе. После инкубации среду удаляли, добавляли равный объем свежей среды и также оценивали интенсивность флуоресценции с использованием инвертированного микроскопа NikonTi-S (фильтр 480/529) и инкубационной ячейки OkolabUno [14].

Для подсчета количества мертвых клеток использовали окрашивание трипановым синим. Клетки снимали трипсином, добавляли равный объем красителя, инкубировали 1 мин, производили подсчет количества окрашенных клеток в камере Горяева.

Повреждение ДНК изучалось с использованием метода электрофореза одиночных клеток в агарозном геле после щелочного лизиса (Cometassay). К трипсинизированным клеткам добавляли равный объем 1 % агарозы и сразу же переносили на слайды. После полимеризации агарозы слайды инкубировали в щелочном лизирующем буфере при 4 °С в течение 18–20 ч (1,2 М NaCl, 100 мМ Na₂EDTA, 0,1 % лаурилсаркозинат натрия, 0,26 М NaOH (pH > 13)). После лизиса слайды промывались в промывочном буфере при комнатной температуре (0,03 М NaOH, 2 мМ Na₂EDTA, pH~12,3). Для электрофореза использовали напряжение 20 В при силе тока 40 мА в течение 20 мин при 4 °С. После электрофореза слайды промывали дистиллированной водой и фиксировали 96%-ным этанолом. Для окрашивания слайдов использовали DNA-DyeNonTox (Amplichem). Для оценки степени повреждения ДНК рассчитывали момент хвоста (*tailmoment*) как произведение процента мигрировавшей ДНК и длины хвоста [15].

Все эксперименты и определения параметров были выполнены с трехкратным повторением. Результаты выражались как среднее значение, ± стандартное отклонение (M±SD). Результаты обработаны статистически, с использованием критерия Стьюдента *t* для парных переменных. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

3. Результаты

На рис. 2 представлены данные, отражающие влияние лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода. При облучении культуры раковых клеток HELA мы наблюдали увеличение концентрации АФК в контрольной группе уже через 1 ч после облучения более чем в 3 раза. Далее на протяжении эксперимента концентрация АФК оставалась высокой и достигала максимума через 6 ч после облучения (рис. 2). Проведенный эксперимент показал, что лазерное излучение на длине волны 1265 нм способно вызвать долгосрочное увеличение концентрации внутриклеточных активных форм кислорода в раковых клетках линии HELA.

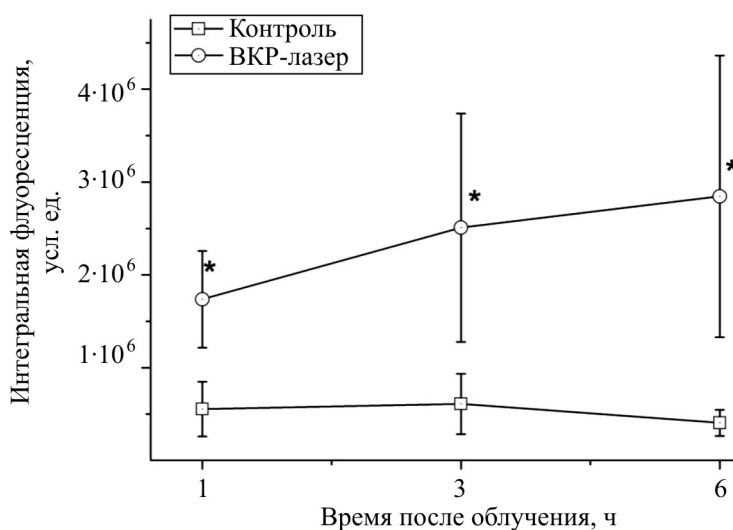


Рис. 2. Динамика изменения внутриклеточной концентрации активных форм кислорода после облучения клеток линии HELA лазерным излучением с длиной волны 1265 нм с плотностью дозы 0,1 Дж/см² (* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой)

Митохондриальный мембранный потенциал является важным показателем метаболической активности клеток, кроме этого, он отражает способность митохондрий генерировать АФК. На рис. 3 представлены данные, отражающие изменение митохондриального мембранного потенциала после облучения клеток линии HELA ВКР-лазером с длиной волны 1265 нм и плотностью дозы 0,1 Дж/см². Как видно из рис. 3, величина совокупного клеточного митохондриального потенциала не разли-

чалась между опытной и контрольной группой в точках 1 и 3 ч. Через 6 ч после начала эксперимента в группе клеток, облучавшихся излучением на длине 1265 нм, нами было зафиксировано снижение митохондриального потенциала в 3,14 раза по сравнению с контрольной группой (см. рис. 3). Таким образом, облучение раковых клеток линии HELA ВКР-лазером с рабочей длиной волны 1265 нм вызывало отсроченное во времени снижение митохондриального потенциала.

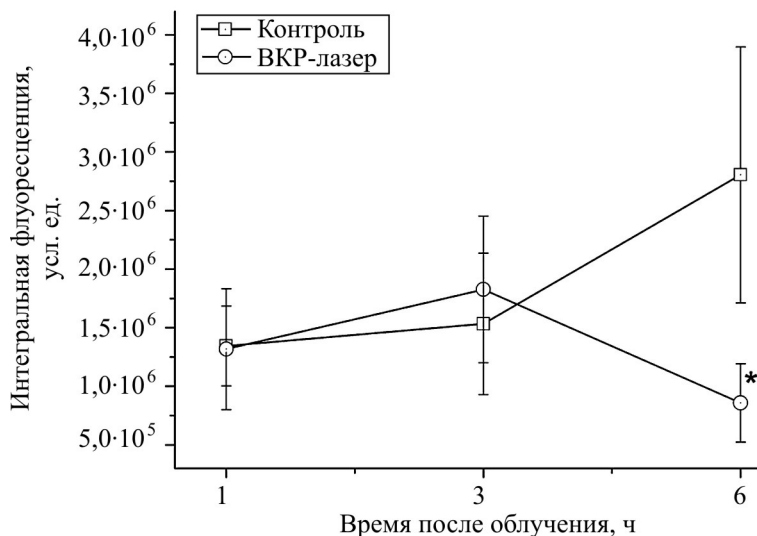


Рис. 3. Динамика изменения совокупного клеточного митохондриального потенциала после облучения клеток линии HELA лазерным излучением с рабочей длиной волны 1265 нм (* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой)

На рис. 4 представлены данные, отражающие влияние ВКР-лазера с рабочей длиной волны 1265 нм на совокупную клеточную митохондриальную массу раковых клеток линии HELA. Как видно из рис. 4, митохондриальная масса в клетках, подвергнутых облучению ВКР-лазером 1265 нм, через 6 ч после облучения была в 1,66 раза ниже по сравнению с контрольной группой. В этой же точке – 6 ч – нами было зафиксировано снижение митохондриального потенциала в группе клеток, облучавшихся ВКР-лазером 1265 нм (см. рис. 2). На основании этих двух экспериментов можно сделать заключение, что снижение митохондриального потенциала в клетках линии HELA после облучения ВКР-лазером, работающим на длине волны 1265 нм, вызвано снижением митохонд-

риальной массы. Таким образом, облучение клеток линии HELA излучением на длине волны 1265 нм вызывает снижение митохондриальной массы.

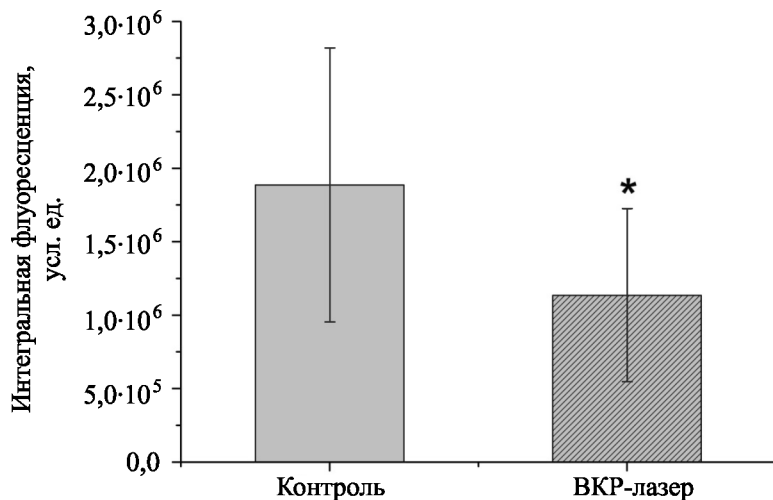


Рис. 4. Митохондриальная масса раковых клеток линии HELA через 6 ч после воздействия лазерного излучения с длиной волны 1265 нм и плотностью излучения 0,1 Дж/см² (* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой)

На рис. 5 показаны повреждения ДНК (тайл-момент) после облучения раковых клеток линии HELA на длине волны 1265 нм. Как видно из рисунка, повреждение ДНК после облучения имеет сложную динамику. Через 15 мин после облучения нами зафиксировано первое увеличение тайл-момента. В точке 15 мин повреждение ДНК в клетках, облучавшихся лазером, в 1,67 раз больше, чем в контрольной группе. В точках 30 мин и 1 ч повреждение ДНК в опытной группе не отличалось от контроля. Через 2 ч после начала эксперимента тайл-момент в группе облучавшихся ВКР-лазером был в 1,42 раза выше, чем в контрольной группе. В дальнейшем показатель повреждения ДНК в опытной группе был все время достоверно выше, чем в контрольной, и достигал максимума через 6 ч после облучения. Так, через 3 ч величина тайл-момента в опытной группе была в 1,48 раз выше, чем в контрольной группе, через 4 ч в 1,6 раза, а через 6 ч в 2,41 раза выше, чем в контрольной группе. Эксперимент по изучению влияния лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на повреждение ДНК в клетках линии

HELA продемонстрировал наличие сложной динамики изменения количества разрывов цепей ДНК, которую можно разделить на три этапа: первый этап заключается в росте повреждения ДНК через 15 мин после облучения лазером; второй этап характеризуется снижением тайл-момента до значений, характерных для контрольной группы в период времени 30 мин – 1 ч; третий этап характеризуется повышением тайл-момента облученных клеток.

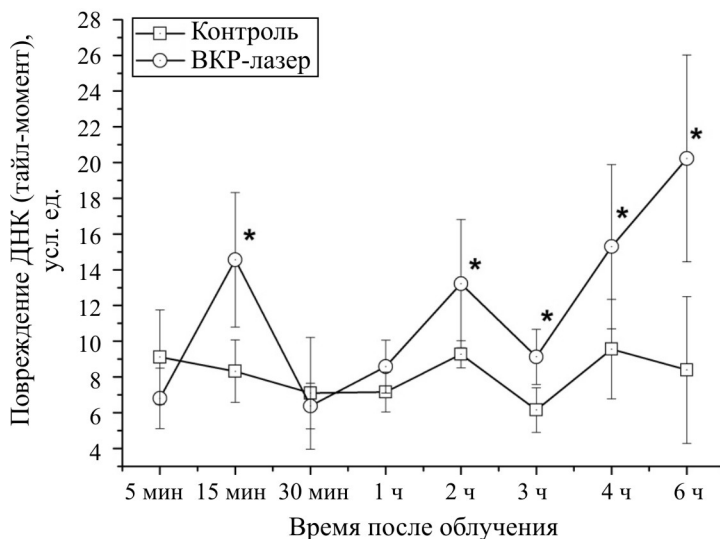


Рис. 5. Динамика изменения повреждения ДНК после облучения клеток линии HELA лазерным излучением с рабочей длиной волны 1265 нм и плотностью облучения 0,1 Дж/см², выраженная через тайл-момент (* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой)

На рис. 6 представлены данные по влиянию лазерного излучения с длиной волны 1265 нм на смертность раковых клеток линии HELA. Как видно из рисунка, воздействие лазерного излучения с соответствующей длиной волны в течение 10 мин приводило к значительному росту клеток с признаками деградации в сравнении с контрольной группой. Через 24 ч после облучения лазером смертность в опытной группе составила 19,27 %, тогда как в контрольной группе – 1,27 %. Таким образом, можно сделать заключение, что облучение раковых клеток линии HELA соответствующим лазером вызывает их существенную гибель.

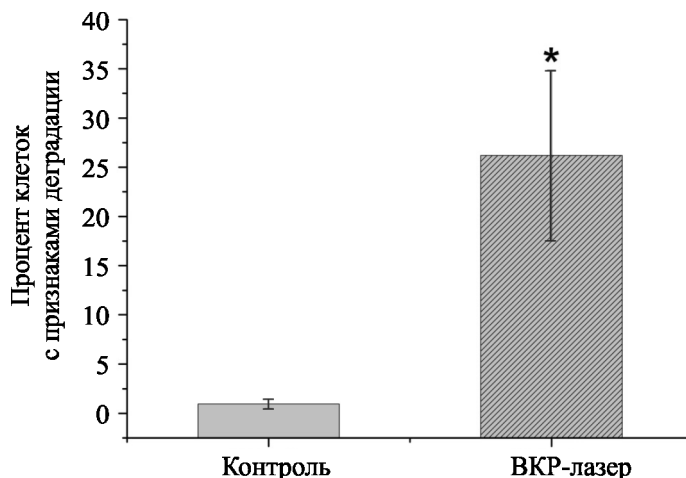


Рис. 6. Количество раковых клеток линии HELA с признаками деградации через 24 ч после воздействия лазерного облучения на длине волны 1265 нм (* – $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой)

4. Обсуждение

В ряде работ было продемонстрировано, что лазер с длиной волны 1260–1270 нм способен вызывать образование синглетного кислорода в клетках [2, 3]. Синглетный кислород является возбужденным состоянием молекулярного кислорода. Он играет важную роль во многих химических и биологических процессах дыхания и фотоокисления. Высокая окислительная активность синглетного кислорода делает привлекательным его использование в терапевтических целях, в частности в разрушении раковых опухолей. Считается, что основным цитотоксическим агентом в фотодинамической терапии является синглетный кислород. В этом методе лечения рака синглетный кислород генерируется в присутствии фотосенсибилизаторов, которые являются посредниками в передачи энергии фотонов к молекулярному кислороду [1]. Эффективность синглетного кислорода зависит от места его генерации. Экспериментально установлено, что если синглетный кислород генерируется в митохондриях, то он с большей эффективностью способен убивать раковые клетки, по сравнению с тем, если бы он генерировался в цитоплазме [6]. Синглетный кислород обладает очень коротким периодом жизни, порядка 10^{-11} – 10^{-9} с, поэтому способен оказывать влияние только в очень ограниченном пространстве порядка 0,01–0,02 мкм [7]. В основном синглетный кислород окисляет аминокислотные остатки

белков. Эффективность окисления аминокислотных остатков белков синглетным кислородом в 2 раза выше, чем ненасыщенных жирных кислот [16]. Повреждающий эффект синглетного кислорода в присутствии фотосенсибилизаторов связан с повреждением белков и сильно зависит от их локализации. Наиболее сильный повреждающий эффект синглетного кислорода наблюдается, если фотосенсибилизатор локализуется в митохондриальной мембране [17]. В этом случае он вызывает повреждение митохондриальных пор, что приводит к нарушению функционирования митохондрий и клеточной смерти [18].

В наших экспериментах облучение раковых клеток линии HELA ВКР-лазером с рабочей длиной волны 1265 нм в течение 10 мин с относительно небольшой общей плотностью излучения $0,1 \text{ Дж/см}^2$ вызвало значительное увеличение смертности по сравнению с контрольной группой (см. рис. 5), что свидетельствует о генерации повреждающего агента. Ранее было установлено, что лазер с длиной волны 1260–1270 нм способен генерировать синглетный кислород [2, 3], следовательно, можно отталкиваться от факта, что основным повреждающим агентом является синглетный кислород. Анализ динамики внутриклеточной концентрации АФК (см. рис. 1) показывает, что облучение лазером в соответствующем диапазоне длин волн (около 1265 нм) вызывает устойчивый рост в течение всего времени наблюдения. Источником АФК при нормальных условиях могут быть различные клеточные процессы, к которым можно отнести побочные продукты деятельности дыхательной цепи, НАДФН оксидазы, ксантин оксидазы и оксигеназыарахидоновой кислоты [19]. Однако, по мнению многих исследователей, значительным источником АФК является митохондриальная дыхательная цепь [9, 19, 20]. Количество АФК, образующихся в процессе нормального клеточного метаболизма, сопоставимо или даже превосходит количество АФК, образовавшихся в результате внешнего воздействия, например после ультрафиолетового или радиационного облучения [9, 19, 20]. Динамика митохондриального потенциала показывает, что в течение первых трех часов после облучения ВКР-лазером 1265 нм в опытной группе он не отличается от контрольной, а через 6 ч в опытной группе митохондриальный потенциал становится значительно ниже по сравнению с контрольной группой (см. рис. 2). Снижение митохондриального потенциала в опытной группе вызвано разрушением митохондрий, а не снижением их функциональной активности. Об этом

свидетельствует снижение митохондриальной массы в группе клеток, облучавшихся ВКР-лазером. Такая конфигурация соотношения митохондриального потенциала и митохондриальной массы в клетках, облучавшихся лазером, походит на данные, получаемые в случае экспериментов с генерацией синглетного кислорода в митохондриях [6, 18]. Динамика повреждения ДНК (см. рис. 4) в клетках, подвергшихся действию ВКР-лазера 1265 нм, свидетельствует о том, что основным повреждающим агентом является не синглетный кислород, а АФК, генерируемые митохондриями. Мы наблюдали пик повреждения ДНК через 15 мин после облучения, что, несомненно, является следствием увеличения концентрации синглетного кислорода, но далее в период времени 30 мин – 1 ч происходит репарация повреждений и тайл-момент в опытной группе не отличается от такового в контрольной группе (см. рис. 4). Дальнейший рост тайл-момента в период 2–6 ч не связан с синглетным кислородом и является следствием увеличения концентрации АФК (см. рис. 1) из другого источника, которым, по нашему мнению, являются митохондрии.

Митохондрии содержат большое количество молекул с порфириновой структурой; к ним можно отнести цитохромы *a*, *b*, *c*, *p450*, которые могут быть потенциальными фотосенсибилизаторами. Нами не было найдено данных о спектрах поглощения природных цитохромов в инфракрасной области. Существуют данные, что искусственные производные порфиринов имеют спектры поглощения в инфракрасном диапазоне, в частности в районе 1260 нм [9]. Но, по нашему мнению, ведущую роль в повреждающем эффекте ВКР-лазера с рабочей длиной волны 1265 нм может играть образование синглетного кислорода в непосредственной близости от цитохрома *aa₃*. Важность цитохрома *aa₃* в механизмах возникновения митохондриально зависимого оксидативного стресса продемонстрирована ранее в [21]. Именно этот цитохром непосредственно взаимодействует с кислородом, и активация кислорода ВКР-лазером до синглетного состояния может существенно его повреждать.

5. Заключение

Облучение раковых клеток линии HELA ВКР-лазером с рабочей длиной волны 1265 нм индуцировало клеточную смертность через увеличение концентрации внутриклеточных активных форм кислорода, увеличение повреждения ДНК, снижение митохондриального потенциала и митохондриальной массы. Одним из существенных повреж-

дающих эффектов при облучении ВКР-лазером 1265 нм раковых клеток может являться синглетный кислород, генерируемый в области цитохрома *aa*³, однако это заключение требует дальнейшей экспериментально проверки.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственное задание № 6.1617.2014/К).

Список литературы

1. Photodynamic therapy of cancer: an update / P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, N.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61 (4). – P. 250-81.
2. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells / S.G. Sokolovski, S.A. Zolotovskaya, A. Goltsov [et al.] // *Scientific Reports.* – 2013. – Vol. 3. – P. 3484.
3. Cancerous cell death from sensitizer free photoactivation of singlet oxygen / F. Anquez, I. El Yazidi-Belkoura, S. Randoux, P. Suret, E. Courtade // *Photochem. Photobiol.* – 2012. – Vol. 88. – P. 167.
4. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy / A.S. Yusupov, S.E. Yoncharov, J.D. Zalevskii, V.M. Paramonov, A.S. Kurkov // *Laser Physics.* – 2010. – Vol. 20. – P. 357.
5. Tarr M., Valenzeno D.P. Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo // *Photochem-Photobiol Sci.* – 2003. – Vol. 4. – P. 355.
6. Major determinants of photoinduced cell death: subcellular localization versus photosensitization efficiency / C.S. Oliveira, R. Turchiello, J. Alicia [et al.]. // *Free Rad. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51. – P. 824.
7. Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides // *Photochem Photobiol.* – 1994. – Vol. 59 (3). – P. 284-9.
8. Silva D.C., Czarnecki K., Ryan M.D. Visible and resonance raman spectra of low valent iron porphyrins // *Inorgan. Chim. Acta.* – 1999. – Vol. 287. – P. 21.
9. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 552. – P. 335.
10. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique / E.G. Mik, T. Johannes, C.J. Zuurbier, A.

Heinen, J.H. Houben-Weerts, G.M. Balestra, J. Stap, J.F. Beek, C. Ince // *Biophys J.*, 2008, vol. 95(8), pp. 3977-90.

11. Gayeski T.E., Honig C.R. Intracellular PO₂ in individual cardiac myocytes in dogs, cats, rabbits, ferrets and rats // *Am. J. Physiol.* – 1991. – Vol. 260. – P. H522.

12. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide / Y. Oyama, A. Hayashi, T. Ueha, K. Maekawa // *Brain Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 113-7.

13. Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular disposition of rhodamine dyes / Z. Gan, S.H. Audi, R.D. Bongard, K.M. Gauthier, M.P. Merker // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2011. – Vol. 300. – P. L762.

14. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level / A. Cossarizza, G. Kalashnikova, E. Grassilli, F. Chiappelli, S. Salvioli, M. Capri, D. Barbieri, L. Troiano, D. Monti, C. Franceschi // *Exp. Cell Res.* – 1994. – Vol. 214(1). – P. 323-30.

15. Olive P.L., Banath J.P. *Nature protocols.* – 2006. – Vol. 1. – P. 23.

16. Davies M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 305(3). – P. 761-70.

17. Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy // *J. Bioenerg Biomembr.* – 2007. – Vol. 39(1). – P. 85-9.

18. Ricchelli F., Sileikytė J., Bernardi P. Shedding light on the mitochondrial permeability transition // *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics.* – 2011. – Vol. 1807. – P. 482.

19. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 295(4). – P. 849-68.

20. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial ros-induced ros release: an update and review // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1757. – P. 509.

21. Pope S., Land J.M., Heales S.J. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? // *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics.* – 2008. – Vol. 1777. – P. 794.

References

1. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster N.H., Girotti A.W., Gollnick S.O. [et al.]. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, vol. 61 (4), pp. 250-81.
2. Sokolovski S.G., Zolotovskaya S.A., Goltsov A. Infrared laser pulse triggers increased singlet oxygen production in tumour cells. *Scientific Reports*, 2013, vol. 3, pp. 3484.
3. 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, pp. 167.
4. Yusupov A.S., Yoncharov S.E., Zalevskii J.D., Paramonov V.M., Kurkov A.S. Raman fiber laser for the drug-free photodynamic therapy. *Laser Physics*, 2010, vol. 20, pp. 357.
5. Tarr M., Valenzeno D.P. Singlet oxygen: the relevance of extracellular production mechanisms to oxidative stress in vivo. *PhotochemPhotobiol Sci.*, 2003, vol. 4, pp. 355.
6. Oliveira C.S., Turchiello R., Alicia J. [et al.]. Major determinants of photoinduced cell death: subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Rad. Biol. Med.*, 2011, vol. 51, pp. 824.
7. Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem Photobiol.*, 1994, vol. 59 (3), pp. 284-9.
8. Silva D.C., Czarnecki K., Ryan M.D. Visible and resonance raman spectra of low valent iron porphyrins. *Inorgan. Chim. Acta.*, 1999, vol. 287, pp. 21.
9. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 2003, vol. 552, pp. 335.
10. Mik E.G., Johannes T., Zuurbier C.J., Heinen A., Houben-Weerts J.H., Balestra G.M., Stap J., Beek J.F., Ince C. In vivo mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys J.*, 2008, vol. 95(8), pp. 3977-90.
11. Gayeski T.E., Honig C.R. Intracellular PO₂ in individual cardiac myocytes in dogs, cats, rabbits, ferrets and rats. *Am J Physiol.*, 1991, vol. 260, pp. H522.
12. Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., Maekawa K. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide, *Brain Res.*, 1994, vol. 28, pp. 113-7.

13. Gan Z., Audi S.H., Bongard R.D., Gauthier K.M., Merker M.P. Quantifying mitochondrial and plasma membrane potentials in intact pulmonary arterial endothelial cells based on extracellular disposition of rhodamine dyes. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 2011, vol. 300, pp. 762.

14. Cossarizza A., Kalashnikova G., Grassilli E., Chiappelli F., Salvioli S., Capri M., Barbieri D., Troiano L., Monti D., Franceschi C. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. *Exp Cell Res.*, 1994, vol. 214(1), pp. 323-30.

15. Olive P.L., Banath J.P. *Nature protocols*, 2006, vol. 1, pp. 23.

16. Davies M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003, vol. 305(3), pp. 761-70.

17. Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J. Bioenerg Biomembr*, 2007, vol. 39(1), pp. 85-9.

18. Ricchelli F., Sileikytė J., Bernardi P. Shedding light on the mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, 2011, vol. 1807, pp. 482.

19. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2008, vol. 295(4), pp. 849-68.

20. Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J. Mitochondrial ros-induced ros release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1757, pp. 509.

21. Pope S., Land J.M., Heales S.J. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration; cardiolipin a critical target? *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, 2008, vol. 1777, pp. 794.

Получено 25.11.2014