

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ: ПЕРВИЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

А. А. Красновский мл.

¹*Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, 115071,
Москва, Ленинский пр-т, 33*

²*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119899, Москва, Воробьевы горы*

Изложены основные представления о первичных механизмах, определяющих фотодинамическую регуляцию биологических процессов. Рассмотрены принципы разделения первичных фотодинамических реакций на реакции типа I и II. Синглетный кислород рассматривается как метод анализа механизма фотодинамических реакций. Описаны методы его регистрации, основанные на использовании химических ловушек, измерении инфракрасной фосфоресценции в области 1270 нм и индуцированной синглетным кислородом замедленной флуоресценции красителей, основанной на суммировании одной молекулой красителя энергии двух молекул синглетного кислорода.

Ключевые слова: *фотодинамическое действие, синглетный кислород, фосфоресценция, фталоцианины.*

Введение. Явление, названное фотодинамическим действием, было открыто в работах студента Оскара Рааба и профессора Херманна фон Таппайнера в Мюнхенском Фармакологическом институте и описано в 1900 г. [1,2]. Суть открытия состояла в том, что, когда интенсивность света в поле микроскопа была достаточно большой, окрашенные акридином или другими флуоресцирующими красителями клетки парameции прекращали движение и погибали, причем спектр действия этого эффекта соответствовал спектрам поглощения красителей. Таким образом, был обнаружен способ световой регуляции движения и жизнеспособности клеток. Вскоре было показано, что для наблюдения этого эффекта необходим кислород [3–5]. Более того, освещение изолированных из клеток биологически важных соединений в присутствии красителей приводит к окислению этих соединений кислородом [5]. Эти работы и многочисленные выполненные позже исследования показали, что в основе фотодинамического действия лежит фотосенсибилизированное красителями окисление компонентов клеток кислородом. При этом краситель практически не расходуется, его главная роль состоит в том, что он делает реакции окисления чувствительными к освещению ([6–8] и указанные там ссылки).

В общем случае роль фотосенсибилизатора может играть сам субстрат окисления. Примерами таких эффектов может служить фотоокисление ароматических углеводов, порфиринов и аминокислот ([9,10] и указанные там ссылки). Фотосенсибилизатором может быть также молекулярный кислород, который, поглощая свет, образует реакционно-способное синглетное состояние [11–15]. В итоге процессы фотоокисления органических субстратов кислородом соответствуют приведенной ниже схеме, где показано, что такие реакции могут осуществляться за счет фотовозбуждения красителя (что является наиболее распространенным механизмом и собственно фотодинамическим действием), субстрата или кислорода (рис. 1).

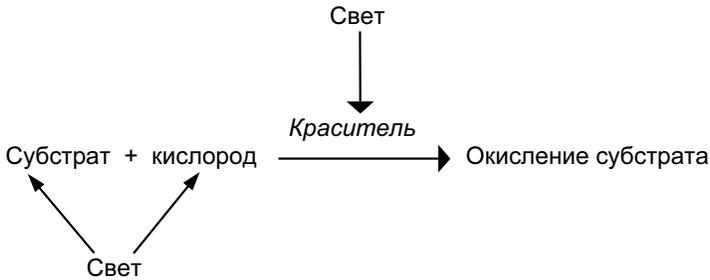


Рис. 1. Фотодинамическое регулирование биологических процессов

В естественных условиях фотодинамическое действие является причиной многообразных биологических эффектов, которые определяют фоторегуляцию метаболизма отдельных клеток, тканей, организмов и целых экосистем.

Общеизвестна реакция травоядных животных на потребление зверобоя (*Hipericum*) и гречихи (*Fagorikum*), связанная с накоплением в крови и коже животных пигментов, родственных по химическому строению, – гиперицина и фагопирина. На ярком солнечном свете эти пигменты вызывают выраженное повреждение кожи (фотодинамические болезни). Такой же эффект вызывают также некоторые другие пигменты растений и, в частности, продукты деградации хлорофилла при их неполном выведении из организма в результате дисфункции печени. Эти эффекты можно рассматривать как способ защиты растений от полного уничтожения травоядными животными и один из факторов регулирования в экосистемах [6–8].

Фотодинамическое действие играет важную роль в регуляции метаболизма содержащих пигменты клеток и организмов, как например, фотосинтезирующие растения и зрительные фоторецепторы. В фотосинтези-

ческом аппарате обусловленное собственным хлорофиллом фотодинамическое окисление приводит к фотоингибированию фотосинтеза, которое выполняет защитную функцию, так как снижает эффективность фотосинтеза при избыточной освещенности и помогает диссипировать в тепло избыток поглощенной энергии. При более высоких интенсивностях света возможно полное подавление активности хлоропластов в результате повреждения фотосинтетических мембран. Однако устойчивость фотосинтетического аппарата к фотодинамическому действию исключительно высока в результате действия выработанных в процессе эволюции и закрепленных генетически эффективных защитных систем ([16–20] и указанные там ссылки). Эффективность этих систем также является элементом регуляции, так как сильно зависит от физиологических условий и, следовательно, определяется биохимическими процессами в клетках и хлоропластах. По нашим данным, наиболее высокий уровень защиты от фотодинамического действия характерен для зеленых растений, выращенных на ярком свете. Растения, адаптированные к слабому освещению, существенно менее устойчивы к фотодинамическому стрессу [18,19].

В зрительных органах также наблюдается фотодинамическое регулирование обменных процессов с целью защиты сетчатки и хрусталика от фотоповреждения. В клетках сетчатки фотодинамическим фотосенсибилизатором служат молекулы ретиналя, которые отделились от молекулы родопсина в результате каскада биохимических процессов, вызванных поглощением света, а также продукты превращения ретиналя, среди которых важная роль принадлежит липофусциновым гранулам, содержащим флуорофор, – бис-ретилиден-этанолamina (A2E). В сетчатке также существует мощная протекторная система, снижающая до минимума фотодинамический стресс. Однако наиболее радикальный механизм защиты состоит в постоянном обновлении фоторецепторных мембран и всего наружного сегмента зрительных клеток клетки (палочек и колбочек), которое позволяет избежать накопления в наружном сегменте молекулярных дефектов. В отличие от хлоропластов сетчатка не предназначена для воздействия яркого солнечного света. Действие такого света приводит к существенным деструктивным последствиям ([21–24] и указанные там ссылки).

В хрусталике фотосенсибилизаторами, вероятно, служат N-формилкинурунин и ксантуреновая кислота, образующиеся при повреждении белков-кристаллинов, которое становится особенно заметным при старении. Накопление этих и других продуктов окисления приводит к пожелтению хрусталика, что также является фактором регуляции, так как защищает сетчатку от действия фотодинамически активного синего и ультрафиолетового излучения [22–24].

В клетках, не имеющих эффективных фоторецепторных систем, фотодинамическое действие как часть окислительного стресса играет сигнальную функцию, активируя экспрессию генов и синтез каскада ферментов, ответственных за защитные реакции клеток [25–27]. Возможно, именно этим объясняются некоторые биологические и терапевтические эффекты, вызванные действием низко интенсивного лазерного излучения видимого диапазона на не содержащие экзогенные красители клетки и ткани [28–31].

Весьма активную дискуссию вызывает механизм воздействия низко, интенсивного инфракрасного света до 1270 нм на живые клетки и ткани. В работах Амбарцумяна и последующих исследованиях Захарова, Иванова и соавторов в течение ряда лет защищается идея, согласно которой инфракрасный и даже красный свет может напрямую возбуждать молекулы кислорода в биологических системах и этим вызывать регулирование метаболизма или даже гибель клеток («светокислородный эффект») [32, 33]. Фотохимической основой для этого представления служат цитированные выше работы по прямому возбуждению кислорода в органических средах [11–15]. Описаны также биологические эксперименты на суспензиях эритроцитов, раковых клетках и опухолях, которые, однако, вызывают неоднозначную реакцию специалистов (см. ссылки в [32,33]).

Фотодинамическое регулирование развития раковых опухолей с помощью введенных в ткани экзогенных красителей, имеющее целью замедление развития или уничтожение опухолей, является в настоящее время интенсивно развивающимся направлением фотомедицины [34–36]. Описано успешное применение фотодинамического действия для разрезания ДНК и уничтожения вирусов [37–39]. Показана возможность использования фотодинамического действия для уничтожения сорняков и вредных насекомых [40]. Фотосенсибилизирующее действие смога и органических загрязнений воздуха и воды является одним из факторов, усиливающих их вредное экологическое действие [41,42].

Таким образом, фотодинамическое действие – весьма важный фактор фоторегуляции биологических процессов в природе, имеющее целый ряд важных практических применений в фотобиохимии, медицине, физиологии растений и других областях. В связи с этим исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе фотодинамических эффектов, – одна из важнейших фундаментальных биологических проблем.

Первичные механизмы фотодинамического действия. Представление о том, что первичные стадии фотодинамического действия одинаковы в живых клетках и растворах органических соединений, позволило уже в первой половине XX столетия сформулировать целый ряд гипотез о молекулярных механизмах фотодинамического эффекта. В центре дискуссии оказались три гипотезы: «первичного фотодегидрирования», «моль-

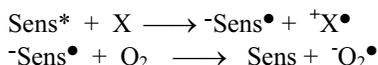
оксида» и «активного кислорода». Простейшее предположение о том, что какая-то одна из этих гипотез характеризует истинный механизм всех фотодинамических реакций, не подтвердилась при экспериментальном анализе. Поэтому полезным оказалось сформулированное Шенком и сотрудниками представление о том, что по характеру первичного процесса все фотодинамические реакции можно разделить на два типа (тип I и тип II). Это представление в форме, модифицированной К. Футом, сейчас является общепринятым. К типу I были отнесены все реакции, первичной стадией которых служит реакция возбужденных молекул фотосенсибилизаторов (Sens*) с субстратами окисления (X). К типу II отнесены процессы, в которых первичным является взаимодействие возбужденных молекул фотосенсибилизаторов с кислородом ([43–45] и указанные там ссылки).

Тип I: $\text{Sens}^* + \text{X} \rightarrow \text{свободно-радикальные интермедиаты} + \text{O}_2 \rightarrow \text{продукты окисления X}$

Тип II: $\text{Sens}^* + \text{O}_2 \rightarrow \text{активные фотопродукты} + \text{X} \rightarrow \text{продукты окисления X}$

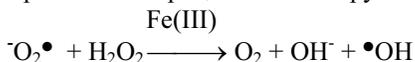
В настоящее время к типу I часто относят все фотохимические реакции, которые идут через первичное образование свободных радикалов даже в том случае, когда кислород вообще не участвует в процессе, а к типу II – фотореакции, которые определяются синглетным кислородом. Такие представления не соответствуют традиционной классификации, которая, как показано выше, основана не на относительном вкладе свободных радикалов, а на характере первичного фотопроцесса. Кроме того, эта классификация предложена только для фотодинамических реакций, т.е. фотореакций, идущих с участием кислорода. Тем не менее указанные «неклассические» представления находят достаточно много сторонников.

Реакции типа I. Первичной стадией этих реакций обычно является отрыв электрона (водорода) от молекулы субстрата (HR) фотовозбужденной молекулой фотосенсибилизатора (*Sens). Роль кислорода состоит в окислении фотовосстановленного фотосенсибилизатора. При этом фотосенсибилизатор переходит в исходное состояние и образуется супероксидный анион-радикал:



В итоге следствием первичной фотореакции является образование двух свободных радикалов $\text{}^+\text{X}^\bullet$ и $\text{}^-\text{O}_2^\bullet$. Дальнейшее развитие окислительного процесса существенно зависит от природы субстратов и фотосенсибилизаторов. Возможно, что при окислении углеводов, спиртов, эфиров, органических кислот и липидов первичные радикалы $\text{}^+\text{X}^\bullet$ или их депрото-

нированные формы присоединяют кислород с образованием реакционно-способных перекисных радикалов RO_2^\bullet . В этих реакциях образуются перекиси органических соединений (ROOH , ROOR), а также стабильные продукты деградации, содержащие кето- и гидроксильные группы. Супероксидные радикалы и их протонированные аналоги – пергидроксильные радикалы также обладают окислительной способностью. Кроме того, при дисмутации они образуют перекись водорода. Реакции перекисей с указанными выше свободными радикалами приводит к образованию еще более сильного окислителя – гидроксильного радикала (реакции Фентона и Габера–Вейса), причем этот процесс катализируется ионами железа:



В живых клетках процессы еще более усложняются из-за присутствия ферментов – пероксидаз и каталазы, активирующих разложение перекисей или их реакции с биосубстратами, а также других про- и антиоксидантных систем [46–48].

Способность хлорофиллов, бактериохлорофиллов, феофитинов и порфиринов к фотореакциям типа I была продемонстрирована в серии классических работ академика А.А. Красновского и сотрудников (реакция Красновского) [49–51]. В этих работах было показано, что освещение анаэробных растворов хлорофилла и его аналогов в присутствии доноров электрона приводит к фотовосстановлению пигментов. Добавление кислорода воздуха или других окислителей вызывает окисление восстановленных форм и регенерацию исходных пигментов. Сравнение эффективности фотовосстановления и тушения флуоресценции донорами электронов привели авторов к заключению, что эти фотореакции определяются триплетными молекулами пигментов.

Причины того, что фотодинамические реакции преимущественно определяются именно триплетными молекулами фотосенсибилизаторов ($^3\text{Sens}^*$), разбирались в серии классических работ А.Н. Теренина [52–54]. Суть в том, что квантовый выход образования $^3\text{Sens}^*$ у фотодинамических красителей не менее 0,2, а время жизни на 4–6 порядков величины больше, чем время жизни возбужденного синглетного состояния фотосенсибилизаторов ($^1\text{Sens}^*$). В связи с этим при случайном характере взаимодействия Sens^* с X высокий квантовый выход первичной фотореакции $^3\text{Sens}^*$ с X достигается при концентрации X на 4–5 порядков меньше, чем у фотореакции $^1\text{Sens}^*$ с X. Кинетический анализ показывает, что в растворах порфиринов при скорости реакции между $^1\text{Sens}^*$ и X, контролируемой диффузией, 10% квантовый выход достигается при $[\text{X}] \geq 1 \text{ мМ}$, что должно сопровождаться 10% тушением флуоресценции красителей. При этом время жизни первичных фотопродуктов настолько мало, что они, как правило, быстро рекомбинируют с образованием исходных компонентов Sens

и X без образования долгоживущих фотопродуктов [54]. При реакции $^3\text{Sens}^*$ с X аналогичный квантовый выход достигается при $[\text{X}] \geq 0.01 \mu\text{M}$ и тушение флуоресценции не наблюдается.

В биологических системах, где возможна прямая адсорбция фотосенсибилизаторов окисляющимися молекулами, вероятность фотореакции $^1\text{Sens}^*$ с HR возрастает. Естественным примером фотодинамической реакции типа I, протекающей через $^1\text{Sens}^*$, является реакция Мелера, сопровождающая фотосинтетический электронный транспорт [55]. В этом случае эффективная утилизация энергии синглетных возбужденных молекул хлорофилла ($^1\text{Sens}^*$) – следствие работы сложноорганизованных пигментных комплексов – реакционных центров, которая приводит к восстановлению переносчиков электрона фотосинтетической электрон-транспортной цепи, реакция которых с молекулярным кислородом приводит к образованию $^1\text{O}_2$ и деструктивным последствиям [16,17,20].

Реакции типа II. Реакции этого типа известны с середины XIX столетия ([43, 44, 56] и указанные там ссылки). В качестве фотосенсибилизаторов использовались хлорофиллы, порфирины, синтетические красители, в качестве субстратов – ароматические углеводороды и линейные и циклические алкены, не содержащие сопряженных связей. Указанные субстраты ведут себя в этих реакциях как акцепторы молекулярного кислорода, присоединяя молекулы O_2 с образованием циклических или гидрперекисей. Кинетическая схема реакций типа II соответствует представлению о первичном взаимодействии между возбужденной молекулой фотосенсибилизатора и кислородом с образованием лабильного интермедиата – «мольоксида», который первоначально представляли как комплекс между Sens^* и O_2 . Представление о существовании такого комплекса было введено в научную литературу первыми исследователями фотодинамического действия и рассматривалось как экстраполяция перекисной теории Баха и Энглера на фотохимический процесс. В наиболее определенной форме эта гипотеза была сформулирована Шенбергом в 1935 г. [57].

В 1928 г. Малликен исходя из теории молекулярных орбиталей пришел к заключению, что молекула кислорода является триплетной в основном состоянии, причем при фотовозбуждении она способна заселять два низколежащих синглетных уровня. Электронный переход из основного состояния на один из синглетных уровней соответствует хорошо известной в то время темно-красной фраунгофферовой линии при 762 нм, принадлежащей спектру поглощения кислорода земной атмосферы. Малликен предположил, что другой синглетный уровень должен иметь более низкую энергию, и предсказал существование еще одной полосы поглощения примерно у 1500 нм, которая в то время не была известна [58,59]. В 1933–1934 гг. предсказание Малликена получило экспериментальное

подтверждение. Новая полоса была действительно обнаружена при ~ 1270 нм в спектрах поглощения жидкого кислорода и кислорода атмосферы [60,61]. В согласии с современной терминологией основное состояние молекулярного кислорода обозначается спектроскопическим символом $^3\Sigma_g^+$, а синглетные – символами $^1\Sigma_g^-$ и $^1\Delta_g$ (рис. 2).

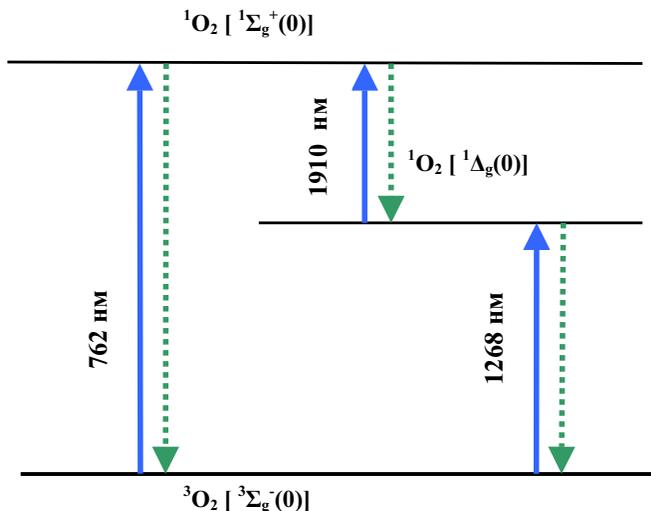


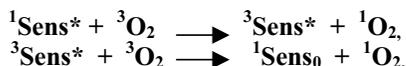
Рис. 2. Схема электронных переходов между основным и низшими синглетными уровнями молекулы кислорода. Цифры в скобках обозначают номер колебательного подуровня. Длины волн соответствуют главным максимумам поглощения и люминесценции, соответствующих этим переходам в молекулах кислорода в газовой фазе

В 1931 г. Каутский предположил, что фотодинамические окислительные реакции могут быть следствием переноса энергии от Sens* на молекулы O_2 , приводящего к возбуждению O_2 и заселению его реакционно-способных синглетных состояний (1O_2). Экспериментальной основой этой гипотезы послужил хорошо известный опыт, в котором наблюдалось фотоокисление субстратов, пространственно отделенных от фотосенсибилизаторов, благодаря адсорбции фотосенсибилизаторов и субстратов на разных зернах силикагеля. Этот опыт показал, что интермедиат, определяющий окисление в этой гетерогенной системе, является газом [62–64]. Интересно, что Рааб уже в первой работе [1] предположил, что первичный интермедиат фотодинамического действия – газ. Впоследствии эффект Каутского был воспроизведен другими исследователями [65–67].

Каутский обратил внимание также на то, что кислород заметно тушит флуоресценцию и замедленную люминесценцию адсорбированных на силикагеле красителей. При этом тушение флуоресценции относительно мало эффективно, а для тушения замедленной люминесценции достаточна ничтожная концентрация кислорода. Не исключая возможности генерации синглетного кислорода за счет тушения флуоресценции красителей, Каутский предположил, что возбужденные молекулы, которые определяют замедленную люминесценцию красителя, преимущественно ответственны за генерацию $^1\text{O}_2$. Подтверждением этого вывода и участия $^1\text{O}_2$ в фотодинамическом эффекте Каутский считал эксперименты Гаффрона, который установил, что квантовый выход ряда фотодинамических реакций практически постоянен в широком интервале относительно низких концентраций кислорода. При жизни Каутского его гипотеза не получила признания.

Альтернативное объяснение экспериментов Каутского предложили Вейс [68] и Франк и Ливингстон [69]. Они высказали предположение, что активная форма кислорода, определяющая фотоокисление, – это пергидроксильный или супероксидный радикал, возникающий в результате окисления возбужденных молекул фотосенсибилизаторов кислородом.

В 1943 г. Теренин указал на то, что правила сохранения спина разрешают два механизма генерации $^1\text{O}_2$ красителями при фотовозбуждении:



где $^1\text{Sens}_0$, $^1\text{Sens}^*$ и $^3\text{Sens}^*$ – молекулы фотосенсибилизаторов в основном и возбужденном синглетном и триплетном состояниях. Первый механизм возможен для ограниченного круга фотосенсибилизаторов, у которых энергетический интервал между триплетным и синглетным состояниями больше энергии одного из синглетных уровней кислорода. Второй механизм возможен для гораздо более широкого круга фотосенсибилизаторов, триплетный уровень которых расположен выше одного из синглетных уровней кислорода (рис. 3) [52,53].

В 1952 г. Теренин и Ермолаев обнаружили эффективный процесс обменно-резонансного переноса энергии между триплетными уровнями молекул красителей [70]. Образование $^1\text{O}_2$ – следствие того же механизма с той разницей, что акцептором энергии является не краситель, а кислород [71]. Оба предложенных Терениным механизма генерации $^1\text{O}_2$ были позже экспериментально обнаружены в газовой фазе и растворах.

Механизмы Теренина полностью объясняли данные Каутского, полученные в гетерогенной системе. Однако в первых работах Теренин полагал, что основная роль в фотохимических реакциях в гомогенных растворах должна принадлежать бирадикальному мольоксиду [52,53]. Позже Шенк установил, что реакционная способность мольоксида в растворах

определяется отношением двух констант – константы скорости реакции мольоксида с субстратом окисления и константой самопроизвольной дезактивации мольоксида [72]. Затем было показано, что кинетические уравнения для фотореакций, идущих через мольоксид или синглетный кислород, одинаковы [73], а реакционная способность мольоксида не зависит от природы фотосенсибилизатора [74].

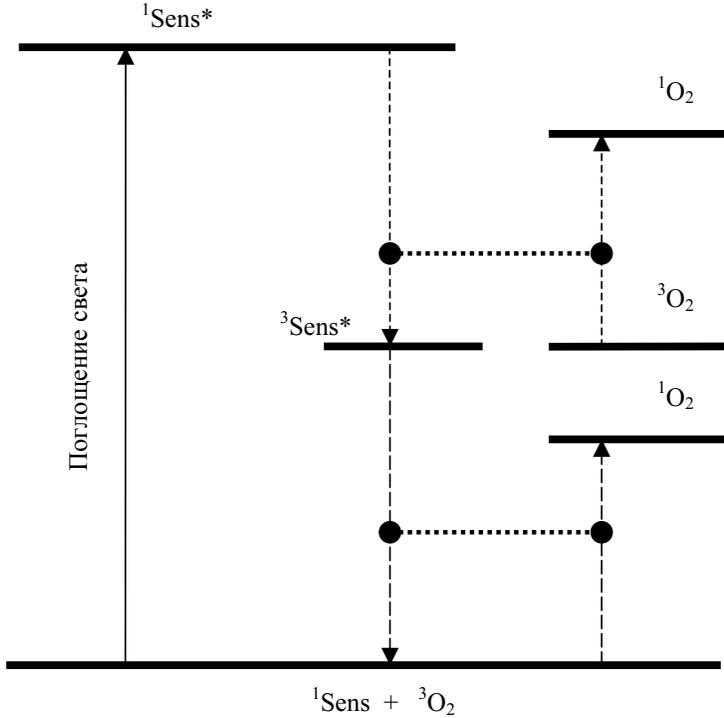


Рис. 3. Энергетическая схема механизмов генерации синглетного кислорода синглетным и триплетным состояниями красителей (механизмы Теренина). Горизонтальные прерывистые линии показывают, что дезактивация соответствующего возбужденного состояния красителя сопряжена с переходом кислорода в возбужденное состояние

Вывод о том, что мольоксид в действительности является синглетным $^1\Delta_g$ -состоянием кислорода, сделал Фут в 1964 г. [75]. Главным аргументом Фута были данные его собственных экспериментов [76] и параллельной работы Кори и Тэйлора (представленной в печать на месяц позже) [77], которые были выполнены под влиянием люминесцентных ис-

следований, выполненных в лабораториях Каши и Огризло в 1963–1964 гг. [78,79]. Эти авторы показали, что $^1\text{O}_2$ возникает в темноте без фотосенсибилизаторов при безэлектродном электрическом разряде в газовой струе или при химической реакции Cl_2 или ClO^- с H_2O_2 . Фут и Векслер [76] и Кори и Тэйлор [77] установили, что образующийся в этих системах $^1\text{O}_2$ вступает в химическое взаимодействие с субстратами фотореакций типа II, причем продукты этого взаимодействия те же, что и при фотохимическом процессе. В дальнейшем было показано, что константы скорости реакций $^1\text{O}_2$ с этими субстратами в указанных химических системах и «молекула» в фотохимических системах одинаковы [80]. Одновременно эти работы показали, что субстраты фотореакций типа II можно рассматривать в качестве химических ловушек синглетного кислорода и использовать реакции их окисления для обнаружения и исследования $^1\text{O}_2$.

Однако выводы Фута не исключали некоторых возможностей для сомнения, так как они базировались на химических методах анализа в системах, содержащих, кроме $^1\text{O}_2$, другие сильные окислители – NaClO , H_2O_2 , возможно, озон и др. В связи с этим в работах Эванса [11], Матесон и Ли [12] и позже других публикациях ([13] и указанные там ссылки) было показано, что окисление ловушек $^1\text{O}_2$ можно наблюдать без фотосенсибилизаторов при прямом фотовозбуждении кислорода красным и инфракрасным светом в растворах, насыщенном кислородом при давлениях около 130 атм. В последнее время в наших работах установлено, что такой же эффект можно наблюдать в системах, насыщенном воздухом, при атмосферном давлении при инфракрасном лазерном возбуждении низкой интенсивности [14,15].

В параллельных исследованиях других лабораторий разрабатывались прямые физические методы обнаружения фотосенсибилизированного образования $^1\text{O}_2$. Снеллинг в 1968 г. обнаружил фотосенсибилизированную парами бензола люминесценцию $^1\Delta_g$ –состояния O_2 (1268 нм) в газовой фазе и показал, что свечение определяется переносом энергии от триплетных молекул фотосенсибилизаторов на кислород [81]. Поскольку время жизни этой люминесценции велико и она сопровождается интеркомбинационный переход в молекуле O_2 (переход из синглетного в триплетное состояние), в дальнейшем для ее обозначения будет использоваться термин «фосфоресценция». В 1969 г. группа исследователей наблюдала в газовой фазе фотосенсибилизированный сигнал ЭПР этого состояния $^1\text{O}_2$ [82,83]. В 1971 г. в газовой фазе была обнаружена фотосенсибилизированная люминесценция (фосфоресценция) $^1\Sigma_g^-$ -состояния O_2 (762 нм) [84, 85].

Применение этих методов к насыщенным воздухом жидким растворам первоначально не давали положительного результата. Метод ЭПР оказался непригодным для анализа сольватированных молекул кислорода. Фотосенсибилизированная красителями фосфоресценция $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$, 1270

нм) в насыщенных воздухом растворах была впервые измерена автором настоящего обзора в 1976 г. [86] и затем в серии последующих работ 1977–1979 гг. с помощью сконструированных в группе автора чувствительных фосфориметров [86–92]. Результаты первого измерения показаны на рис. 4. Свечение возникало в результате переноса энергии от триплетных молекул фотосенсибилизаторов на кислород, как показано на схеме рис. 5. В 1978–1979 гг. это наблюдение было подтверждено другими исследователями [93, 94]. Таким образом, было окончательно доказано, что $^1\text{O}_2$ образуется при фотовозбуждении фотосенсибилизаторов в растворах, а люминесцентный метод исследования $^1\text{O}_2$, наряду с методом химических ловушек, стал широко использоваться для решения фотохимических и фотобиологических задач.

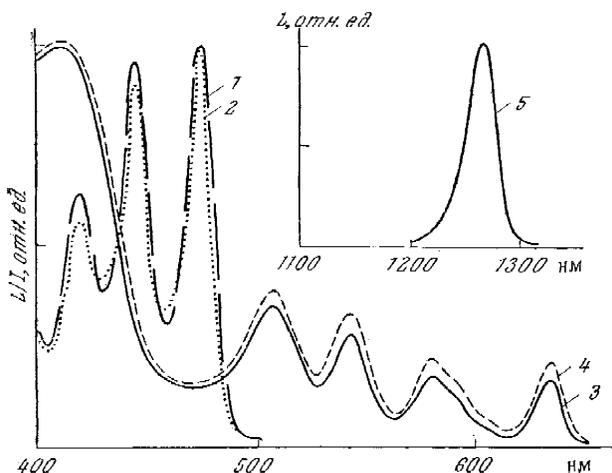


Рис. 4. Спектры поглощения (1,3), спектры возбуждения (2,4) и излучения (5) послесвечения насыщенных воздухом растворов нафтацена (1,2,5) и диметилового эфира протопорфина IX (3–5) в четыреххлористом углеороде [79]

Дальнейшее развитие окислительных процессов в реакциях типа II имеет не менее сложный характер, чем в реакциях типа I. Взаимодействуя с органическими субстратами, $^1\text{O}_2$ образует нестабильные циклические перекиси, которые затем распадаются в термических или ферментативных процессах. При этом возникают продукты деструкции и свободные радикалы. Не исключена возможность, что в некоторых случаях O_2 отрывает электрон от возбужденных молекул красителей (механизм Вейса–Франка) или $^1\text{O}_2$ отрывает электрон от окисляемых субстратов. В этих случаях возникают супероксидные радикалы. Таким образом, реакции типа II не исключают, а наоборот, предполагают образование свободных радикалов

и их включение в деструктивные процессы. В этом смысле фотореакции типа II подобны фотореакциям типа I.

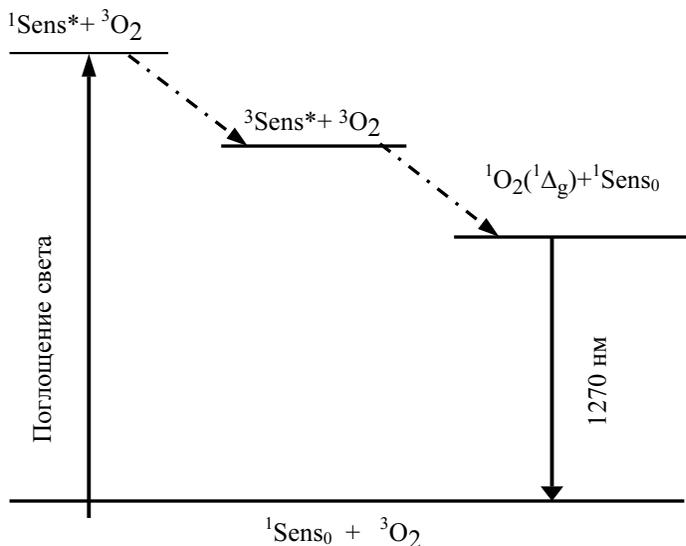


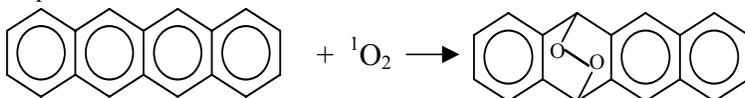
Рис. 5. Схема механизма фотосенсибилизированной фосфоресценции кислорода

Синглетный кислород – индикатор механизма фотодинамических реакций. Как показано выше, основное различие между фотореакциями типа I и II состоит в разном вкладе синглетного кислорода в эти фотопроцессы. Действительно, в фотореакциях типа I его роль незначительна. Реакции типа II, наоборот, определяются преимущественно активностью $^1\text{O}_2$. В реальных химических и биологических системах, как правило, оба механизма действуют одновременно и их относительный вклад сильно зависит от концентрации кислорода, концентрации и природы окисляемых реагентов, природы фотосенсибилизаторов и многих других факторов, причем относительный вклад механизмов типа I или типа II может изменяться в ходе фотохимического процесса. Выявление вклада $^1\text{O}_2$ в реальный фотохимический процесс существенно упрощает задачу исследования его молекулярных механизмов. Поскольку синглетный кислород по физическим и химическим свойствам резко отличается от свободных радикалов, методы выявления $^1\text{O}_2$ в химических и биологических системах также весьма специфичны. В последующих разделах приводится анализ нескольких методов, которые были использованы в группе автора.

Химические свойства $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) и метод химических ловушек.

Химическую активность проявляет только $^1\Delta_g$ -состояние молекулярного кислорода, и именно оно ответственно за фотодинамические реакции типа II [95–97]. Состояние $^1\Sigma_g^-$ химически неактивно из-за крайне малого времени жизни, что обусловлено эффективным тушением этого состояния молекулами растворителей, в результате которого заселяется $^1\Delta_g$ -уровень O_2 [98–101].

Для $^1\Delta_g$ -состояния характерны реакции согласованного присоединения, при которых молекула O_2 соединяется с молекулами реагентов, образуя циклическую перекись. В качестве примера ниже приведена реакция тетрацена с $^1\text{O}_2$:

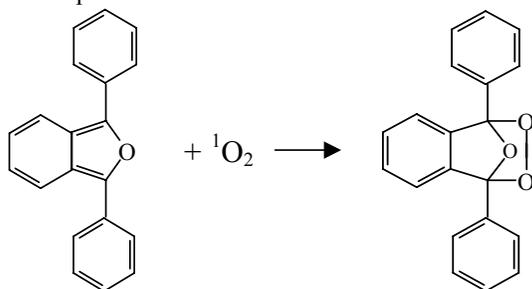


Этим реакции $^1\text{O}_2$ резко отличаются от реакций свободных радикалов, первичной стадией которой является отрыв электрона от окисляющегося субстрата с образованием новых свободных радикалов. Установлено, что субстратами окислительных реакций $^1\Delta_g$ -состояния служат многие биологически важные соединения. В белках и пептидах основной мишенью служат 6 аминокислот: триптофан, гистидин, метионин, тирозин, цистеин, фенилаланин, окисление прочих аминокислот $^1\text{O}_2$ не обнаруживается. В нуклеиновых кислотах окисляются 4-тиоуридин и гуанозин, прочие нуклеотиды устойчивы к окислению. В липидах субстратом являются молекулы ненасыщенных жирных кислот и холестерин. Субстратами окисления служат также токоферолы, тиолы, каротиноиды, порфирины и хлорофиллы, аскорбиновая кислота, восстановленные переносчики электрона, как например НАДН и НАДФН, и другие восстановленные соединения ([95–97, 99, 102–105] и указанные там ссылки).

Наибольшее распространение в качестве химических ловушек $^1\text{O}_2$ получили ароматические углеводороды – 9,10-дифенилантрацен, тетрацен, рубрен и гетероциклические соединения 2,5-диметилфуран, 2,5-дифенилфуран, 1,3-дифенилизобензофуран, фурфуриловый спирт, имидазол. Эти соединения вступают с $^1\text{O}_2$ в реакции 1,4- трансанулярного присоединения. Широко используется также реакция $^1\text{O}_2$ с олефинами, приводящая к образованию гидропероксида и смещению двойной связи. К таким реакциям относится окисление холестерина. Характерные продукты окисления холестерина можно обнаружить с помощью хроматографии. Стерически затрудненные амины, как например 2,2,6,6-тетраметилпиперидин, при реакции с синглетным кислородом образуют стабильные иминоксильные радикалы, что позволяет применять метод ЭПР для обнаружения $^1\text{O}_2$ [106]. Таким образом, образование $^1\text{O}_2$ обнару-

живают по расходованию соединения-ловушки, по накоплению характерных продуктов окисления или по потреблению кислорода в содержащих ловушки системах. Большой интерес представляют водорастворимые ловушки $^1\text{O}_2$, пригодные для использования в биологических системах. Обзор данных по структуре и свойствам таких ловушек приведен в работе [107].

Среди применяемых ловушек 1,3-дифенилизобензофуран используется наиболее широко:



Он пригоден для спектрофотометрического анализа, так как имеет главный максимум поглощения в области 410–415 нм и высокий молярный коэффициент поглощения в этом максимуме ($2.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). При окислении синглетным кислородом 1,3-дифенилизобензофуран образует перекись, которая не имеет полос поглощения в видимой области спектра. Наша оценка показала, что с помощью этого соединения можно обнаруживать $^1\text{O}_2$ при его стационарной концентрации в растворе до 10^{-12} M .

Существенный прогресс в исследовании свойств $^1\text{O}_2$ был достигнут в результате анализа кинетики расходования ловушек при импульсном лазерном возбуждении. Этот метод предложили Меркел и Кирнс в 1971 г., используя 1,3-дифенилизобензофуран в качестве ловушки $^1\text{O}_2$ [108]. С его помощью Кирнсу и его группе удалось выявить целый ряд фундаментальных свойств синглетного кислорода в растворах. В первую очередь им удалось экспериментально оценить время жизни $^1\text{O}_2$ в разных растворителях. Оказалось, что время жизни имеет минимальную величину в воде (около 2 мкс) и максимальную (до 1 мс) в растворителях, молекулы которых не содержали водородных атомов – CS_2 , CCl_4 , фреоны. Замена атомов водорода в молекулах растворителей атомами дейтерия приводила к примерно десятикратному увеличению времени жизни. Исходя из этих данных Меркел и Кирнс предположили, что время жизни определяется эффективностью тушения $^1\text{O}_2$ вследствие индуктивно-резонансного переноса энергии от $^1\text{O}_2$ на колебательные подуровни водородных и других атомов молекул растворителей [109–111]. Полученные значения времени

жизни $^1\text{O}_2$ позволили рассчитать константы скорости взаимодействия многих соединений с синглетным кислородом. В частности, было доказано, что каротиноиды, диазобикарбонил (ДАБЦО) и азид натрия являются физическими тушителями $^1\text{O}_2$ и практически не окисляются синглетным кислородом [95–97, 111]. После этих работ ингибирование фотодинамических реакций физическими тушителями $^1\text{O}_2$ стало широко использоваться в качестве метода анализа их механизма. В качестве активирующего воздействия было предложено заменить растворитель его аналогом, в котором атомы водорода заменены атомами дейтерия. В дейтерированных средах увеличивается время жизни и, следовательно, химическая активность $^1\text{O}_2$.

Сочетание химических методов обнаружения $^1\text{O}_2$ с применением активаторов и тушителей предоставляет исследователям широкие возможности для анализа, тем более что такие методы отличаются простотой и высокой чувствительностью. Однако надежность информации, получаемой с их помощью, существенно ограничивается тем, что химические ловушки, тушители и активаторы $^1\text{O}_2$ взаимодействуют не только с синглетным кислородом, но также со свободными радикалами, перекисями, возбужденными молекулами фотосенсибилизаторов. Кроме того, продукты окисления ловушек фоточувствительны, что создает дополнительные трудности для анализа. В биологических системах эффекты еще более усложняются, так как тушители, акцепторы и активаторы $^1\text{O}_2$ влияют на метаболизм клеток, подавляя фосфорилирование, дыхание, активность различных ферментов [97, 112–114]. В связи с этим химические методы обнаружения $^1\text{O}_2$ не всегда дают ясное представление об образовании синглетного кислорода в исследуемых процессах. Эксперименты показывают, что вероятность ошибок наиболее высока при изучении систем, в которых время жизни $^1\text{O}_2$ – более нескольких миллисекунд или менее нескольких микросекунд. В первом случае для получения достоверных данных необходимо использовать очень низкие концентрации ловушек, чтобы свести к минимуму влияние химической активности ловушек на исследуемые системы. Это, очевидно, существенно затрудняет анализ. Во втором случае необходимы слишком высокие концентрации ловушек, при которых становятся эффективными не связанные с $^1\text{O}_2$ химические (биохимические) процессы.

Фосфоресценция $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) и методы ее измерения. Измерение фосфоресценции $^1\text{O}_2$ – существенно более надежный метод обнаружения и анализа синглетного кислорода, чем метод химических ловушек, поскольку искажения, связанные с присутствием химически активных ловушек, при фосфоресцентном методе отсутствуют. Кроме того, по спектральным и кинетическим параметрам фосфоресценция $^1\text{O}_2$ существенно отличается от свечений другой природы. Однако интенсивность фосфо-

ресценции мала, а спектральная область (1270 нм) неудобна для оптических измерений. В связи с этим для ее измерения необходимы специальные высокочувствительные приборы.

Первые измерения (1976–1979 г.) фотосенсибилизированной фосфоресценции $^1\text{O}_2$ были выполнены с помощью установок с механическими фосфороскопами, которые позволяли измерять спектры возбуждения и излучения фосфоресценции, а также ее время жизни в тех средах, в которых время жизни фосфоресценции превышало 500 мкс [86–92]. В качестве фотодетекторов использовались фотоумножители ФЭУ-83 со спектральной характеристикой С-1, охлаждаемые до -60°C . Особенность этих установок состояла в том, что периоды возбуждения фосфоресценции и ее регистрации разделены темновым интервалом не менее 200 мкс. В результате этого попадание на фотоумножитель возбуждающего света или света флуоресценции образцов полностью исключено, чем достигается исключительно высокая чувствительность фосфоресцентных измерений. На рис. 6 изображена одна из первых модификаций установки с фосфороскопом, собранная еще до широкого использования компьютеров. В настоящее время регистрация сигнала осуществляется компьютерной платой АЦП, позволяющей измерять не только суммарный сигнал фосфоресценции, но и кинетику ее затухания в период открытия окон фосфороскопа.

В установках следующего поколения фосфороскоп был удален и измерения выполнялись в режиме обычного спектрофлуориметра с возбуждением от стационарных, а затем импульсных источников света. В 1979 г. в Минске был разработан метод разрешенной во времени регистрации фосфоресценции, основанный не на механическом прерывании возбуждающего света, а на использовании импульсных ламп и лазеров [115, 116]. Детекторами служили фотоумножители С-1 или фотодиоды, регистрация сигнала осуществлялась с помощью запоминающих осциллографов. В 1982 г. аналогичные приборы появились в США [117–121], а в 1986 г. – в Западной Европе [122]. В этих приборах для возбуждения фосфоресценции использовались относительно интенсивные лазерные вспышки (не менее 500 мкДж), фосфоресценция регистрировалась через интерференционный светофильтр с максимумом пропускания при 1270 нм, сигнал фотоприемника усредняли не более чем по трем лазерным вспышкам, временное разрешение не превышало 2–3 мкс.

В 1983 г. нам удалось существенно улучшить чувствительность разрешенных во времени измерений за счет применения техники счета фотонов и накопления сигнала от большого числа (сотен тысяч и более) лазерных вспышек в результате использования лазеров с высокой частотой повторения импульсов [122]. Эти изменения настолько увеличили отношение сигнала к шуму, что мы получили возможность применять возбуждающие лазерные вспышки с резко уменьшенной энергией (до 10 мкДж)

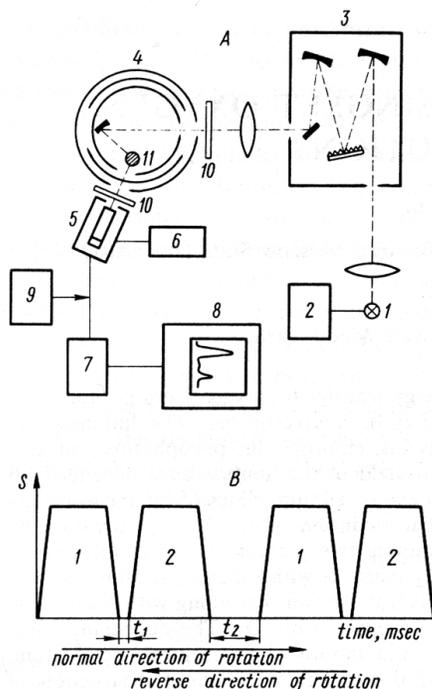


Рис. 6.

А. Установка с механическим фосфороскопом для регистрации фосфоресценции синглетного кислорода в растворах, где 1,2 – ксеноновая лампа 1 кВт с блоком питания, 3 – дифракционный монохроматор, 4 – фосфороскоп, 5,6 – фотоумножитель с блоком питания, 7 – усилитель, 9 – осциллограф, 8 – регистрирующая система, 10 – светофильтры, 11 – исследуемый образец.

В. Диаграмма, показывающая последовательность открытия и закрытия окон фосфороскопа: 1 – фаза возбуждения люминесценции, 2 – фаза измерения люминесценции, t_1 и t_2 – темновые интервалы

и измерять фосфоресценцию через монохроматор, т. е. контролировать спектры фосфоресценции ([122–124] и указанные там ссылки). В 1988 г. благодаря применению техники, разрешенной во времени регистрации одиночных фотонов, нам удалось добиться наносекундного разрешения [125–127]. В последующие годы эти установки были нами существенно улучшены за счет применения более совершенных лазерных генераторов и электронных регистрирующих систем ([128–131] и указанные там ссылки). Блок-схема последней модификация этой установки, работающей в настоящее время в нашей лаборатории, показана на рис. 7 [131].

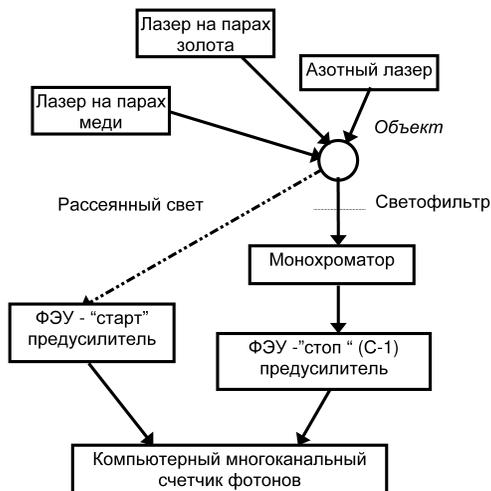


Рис. 7. Блок-схема лазерного спектрометра для измерения флуоресценции синглетного кислорода с наносекундным разрешением

В 1997 г. аналогичные приборы появились в Японии [132], а затем в Германии [133], Канаде [134], Дании [135] и Чехии [136]. Эти работы основаны на новых фотоумножителях фирмы Hamamatsu (Япония) с полупроводниковым фотокатодом. Эта техника рассматривается сейчас как наиболее эффективная, так как позволяет сочетать измерение кинетики с наносекундным разрешением и спектра флуоресценции.

Кинетика флуоресценции. Кинетический анализ механизма флуоресценции, основанного на переносе энергии от триплетных молекул фотосенсибилизаторов на кислород (рис. 5), дает следующее уравнение для кинетики флуоресценции после короткой лазерной вспышки в насыщенных воздухом растворах:

$$I(t) = \frac{k_{et} \cdot k_{rad} [{}^3\text{Sens}^*]_0 \cdot [\text{O}_2]}{(1/\tau_1 - 1/\tau_\Delta)} [\exp(-t/\tau_\Delta) - \exp(-t/\tau_1)], \quad (1)$$

где k_{et} – константа скорости генерации ${}^1\text{O}_2$ в результате переноса энергии от ${}^3\text{Sens}^*$ на кислород, k_{rad} – константа скорости излучательной дезактивации ${}^1\text{O}_2$, τ_1 – время жизни ${}^3\text{Sens}^*$ в насыщенном воздухом растворе, τ_Δ – время жизни ${}^1\text{O}_2$, $[{}^3\text{Sens}^*]_0$ – концентрация триплетных молекул фотосенсибилизатора в момент окончания лазерной вспышки, $[\text{O}_2]$ – концентрация кислорода в растворе ([126,127] и указанные там ссылки).

Кинетические кривые, соответствующие этому уравнению, имеют колоколообразную форму и две фазы – нарастания и затухания. Анализ уравнения показывает, что, если $\tau_{\Delta} > \tau_i$, фаза нарастания определяется скоростью образования $^1\text{O}_2$ в результате переноса энергии от $^3\text{Sens}^*$ на O_2 , фаза затухания – процессом дезактивации $^1\text{O}_2$. Если $\tau_{\Delta} < \tau_i$, предэкспоненциальный множитель меняет знак и поэтому фаза нарастания определяется скоростью дезактивации $^1\text{O}_2$, а фаза затухания – скоростью образования $^1\text{O}_2$ в результате переноса энергии от $^3\text{Sens}^*$ на O_2 .

Поскольку кислород эффективно тушит триплетное состояние фотосенсибилизаторов, $\tau_i = 1/k_{\text{tox}}[\text{O}_2]$, где k_{tox} – константа скорости тушения $^3\text{Sens}^*$ кислородом в жидких растворах – равна $\approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, а $[\text{O}_2]$ – концентрация кислорода, которая в насыщенных воздухом органических растворителях равна $\approx 2 \text{ mM}$. Отсюда, в органических растворителях τ_i равно нескольким сотням наносекунд. Время жизни синглетного кислорода (τ_{Δ}) в этих средах много больше этой величины. При таких условиях, согласно формуле (1), максимум должен наблюдаться через 1–3 мкс после лазерной вспышки. Еще через 2–3 мкс затухание становится моноэкспоненциальным с постоянной времени, соответствующей τ_{Δ} . Очевидно, что при таких кинетических параметрах для регистрации неискаженных кинетических кривых необходимы фосфориметры с наносекундным разрешением, а приборы с микросекундным разрешением пригодны только для анализа фазы затухания.

Уже первые фосфоресцентные измерения τ_{Δ} , выполненные в нашей лаборатории на установках с фосфороскопами, позволили установить, что в растворах порфиринов в CCl_4 $\tau_{\Delta} \approx 30 \text{ мс}$ [87–92], что почти в 40 раз больше величины, полученной ранее с помощью химических ловушек синглетного кислорода в группе Кирнса [109, 110]. Последующие кинетические измерения подтвердили полученное нами высокое значение τ_{Δ} [115, 116, 137]. В высоко очищенном CCl_4 $\tau_{\Delta} = 87 \text{ мс}$ [138, 139]. Близкие значения τ_{Δ} (25–100 мс) оказались характерными также и для других растворителей, молекулы которых не содержат атомов водорода [137–139].

Дальнейшие фосфоресцентные измерения с помощью установок с лазерным возбуждением показали, что в органических растворителях, молекулы которых содержат атомы водорода, τ_{Δ} составляет 10–300 мкс и отличия от данных химического метода не столь значительны. Замена атомов водорода на дейтерий приводила к увеличению τ_{Δ} в 20–30 раз [116–119]. Таким образом, фосфоресцентные измерения позволили существенно уточнить информацию о длительности жизни $^1\text{O}_2$ и еще более усилили аргументы в пользу представления о том, что в растворах она определяется тушением молекулами растворителей за счет переноса энергии от $^1\text{O}_2$ преимущественно на колебательные подуровни Н-атомов.

Применение установок с наносекундным разрешением позволило установить, что кинетика флуоресценции $^1\text{O}_2$ в насыщенных воздухом растворах фотосенсибилизаторов в органических средах и воде при импульсном лазерном возбуждении действительно хорошо описывается двухэкспоненциальным уравнением:

$$I(t) = I_0 [\exp(-t/\tau_{\text{decay}}) - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})], \quad (2)$$

где I_0 – предэкспоненциальный множитель, τ_{decay} – постоянная времени затухания, а τ_{rise} – постоянная времени нарастания флуоресценции (рис. 8). Табл. 1 показывает значения τ_{rise} и τ_{decay} в насыщенных воздухом растворах тетрафенилпорфина в разных растворителях. Из таблицы видно, что в насыщенных воздухом бензоле, этаноле и воде $\tau_{\text{rise}} = \tau_t = 0,35\text{--}2$ мкс, τ_{decay} очень сильно зависит от природы растворителя и соответствует времени жизни $^1\text{O}_2$ (τ_Δ).

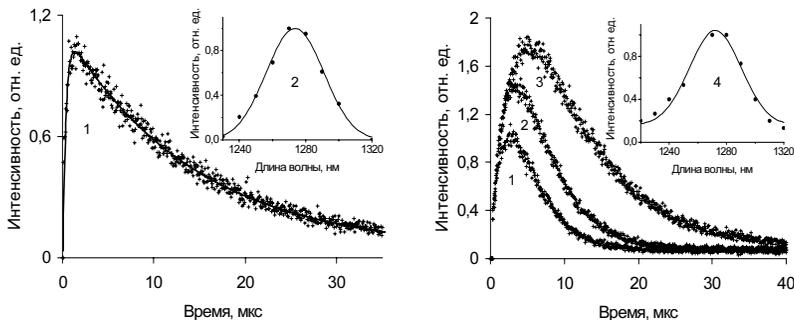


Рис. 8.

А. Кинетическая кривая (1) и спектр (2) флуоресценции $^1\text{O}_2$ в насыщенном воздухом спиртовом растворе ТСФП (15 мкМ) после лазерной вспышки. Кинетическая кривая получена в результате накопления сигнала от $2,4 \cdot 10^6$ лазерных импульсов; данные измерений показаны точками, аппроксимация кинетической кривой – сплошной линией. Спектр соответствует суммарной интенсивности флуоресценции в интервале 1–45 мкс после лазерной вспышки.

Б. Кинетическая кривая (1) и спектр (2) флуоресценции $^1\text{O}_2$ в насыщенном воздухом растворе ТСФП (15 мкМ, pH 5.8) в воде (1), и водных растворах Тритона X-100, содержащих 1 и 80% детергента (2,3) при импульсном лазерном возбуждении. Кривые получены в результате накопления сигнала от $\sim 10^7$ лазерных импульсов; данные измерений показаны точками, аппроксимация – сплошной линией [117]

Кинетические исследования флуоресценции позволили детально изучить эффективность генерации и тушения $^1\text{O}_2$ многими биологически важными соединениями и существенно уточнить константы скорости их

взаимодействия с синглетным кислородом. Эти данные были использованы для оценки времени жизни и длины пробега молекул $^1\text{O}_2$ в биологических системах ([128, 129] и указанные там ссылки).

Таблица 1. Кинетические параметры фосфоресценции синглетного кислорода в насыщенных воздухом растворах тетрфенилпорфина в разных растворителях

| Растворитель | τ_{decay} , МКС ($\pm 5\%$) | τ_{rise} , МКС ($\pm 10\%$) | τ_f , МКС* ($\pm 10\%$) |
|----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Бензол | 30 | 0,35 | 0,40 |
| Этанол | 13,5 | 0,40 | 0,40 |
| Вода | 3,15 | 2,0 | 2,0 |
| Оксид дейтерия | 68 | 2,5 | 2,5 |

*Данные получены методом флеш-фотолиза в насыщенных воздухом растворах

Судя по этим данным, в живых клетках τ_{Δ} составляет 20–200 нс, что существенно меньше τ_f . Согласно уравнению (1), это должно приводить к инвертированию кинетики фосфоресценции, т.е. $\tau_{rise} = \tau_{\Delta}$, а $\tau_{decay} = \tau_f$. Проведенное нами моделирование этой ситуации на примере водных растворов порфиринов, содержащих тушитель $^1\text{O}_2$ – азид натрия, показало, что такое инвертирование действительно происходит [130, 131, 140]. Регистрация аналогичных кинетических кривых непосредственно в содержащих красители живых клетках и тканях – технически сложная задача из-за крайне низкого квантового выхода фосфоресценции [128, 129, 141]. Несколько лет назад нам удалось провести кинетические измерения фосфоресценции $^1\text{O}_2$ в суспензиях окрашенных порфиринами клеток дрожжей и плазмы крови в водных буферных растворах [125, 126, 140]. В 2002 г. в работе [134] с помощью фотоумножителя нового поколения (Япония) авторам удалось измерить кинетику затухания фосфоресценции в окрашенных тканях кожи, печени крысы и суспензиях раковых клеток. Zeberg и др. сконструировали фосфоресцентный микроскоп и измерили фосфоресценцию кислорода в окрашенной порфирином нервной клетке [135]. В последнее время эта же группа провела кинетические измерения фосфоресценции кислорода в ядре и цитоплазме клеток, и было обнаружено, что время жизни синглетного кислорода в этих объектах существенно больше, чем предполагалось ранее [142]. Бильски и др. исследовали фосфоресценцию синглетного кислорода в окрашенных красителями кератиноцитах и суспензиях грибов [143]. Это показывает, что фосфоресцентный метод перспективен для анализа концентрации $^1\text{O}_2$ непосредственно в живых тканях и при дальнейшем развитии может оказать реальную помощь при клиническом применении фотодинамической терапии.

Люминесценция, обусловленная суммированием энергии двух молекул $^1\text{O}_2$. Другим интересным подходом к исследованию синглетного

кислорода может служить обнаруженная в нашей группе серия других люминесцентных явлений. Уже в первых работах, выполненных с помощью механического фосфороскопа, нами было показано, что при фотосенсибилизированной генерации $^1\text{O}_2$ одновременно с его фосфоресценцией при 1270 нм возникает свечение в видимой области спектра с максимумом в области 700 нм, интенсивность которого пропорциональна квадрату интенсивности возбуждающего света [86,88,91]. Подробный анализ этого эффекта показал, что в растворах фотосенсибилизаторов, обладающих коротковолновой флуоресценцией (главный максимум – в области $\lambda \leq 550$ нм), спектр свечения совпадал со спектром излучения димеров (димолей) молекулярного кислорода ($^1\text{O}_2$)₂, с главным максимумом при 703 нм и менее интенсивными полосами при 635 и 765–775 [144–146] (рис. 9).

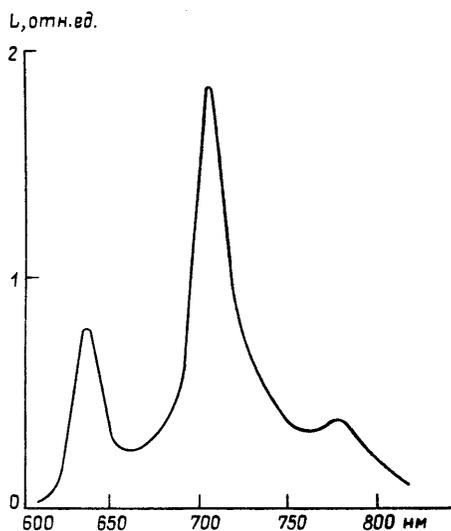


Рис. 9. Спектр фотосенсибилизированной люминесценции димолей ($^1\text{O}_2$)₂ в насыщенных воздухом растворах дибензопиренхинона в насыщенном воздухом четыреххлористом углеводе [127–129]

Кинетика затухания этого свечения и зависимость его интенсивности от интенсивности возбуждения соответствует представлению о том, что в акте возбуждения люминесценции принимают участие две молекулы $^1\text{O}_2$ и одна молекула красителя. В тех случаях, когда максимум флуоресценции красителей – фотосенсибилизаторов расположен в области $\lambda \geq 700$ нм, наблюдалась замедленная флуоресценция красителей. Кинетические параметры свечения свидетельствуют о том, что для излучения

одного фотона замедленной флуоресценции красителя также необходимо взаимодействие одной молекулы красителя с двумя молекулами $^1\text{O}_2$. Наиболее эффективными излучателями этого свечения оказались производные фталоцианина и нафталоцианина [144–146].

Таблица 2. Константы скорости тушения ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) фосфоресценции $^1\text{O}_2$ при 1270 (k_q^{1270}) и индуцированной $^1\text{O}_2$ люминесценции ТБФЦ при 700 (k_q^{700}) нм в C_6D_6

| Тушитель | k_q^{1270} | k_q^{700} |
|---|----------------------|----------------------|
| Лауриновая кислота | 9400 | 18500 |
| 2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенол (β -ионол) | 1.3×10^6 | 2.6×10^6 |
| α -токоферол | 2.1×10^8 | 3.9×10^8 |
| Транс- β -каротин | 1.5×10^{10} | 3.1×10^{10} |

Разрешенные во времени измерения замедленной флуоресценции тетра(4-*трет*-бутил) фталоцианина (ТБФЦ) в органических растворителях при импульсном лазерном возбуждении были выполнены автором в сотрудничестве с К. Футом (рис. 10). В результате было установлено, что при низкоинтенсивном лазерном возбуждении интенсивность замедленной флуоресценции в растворах ТБФЦ в дейтерированном бензоле на 2–4 порядка величины превышает интенсивность ИК фосфоресценции $^1\text{O}_2$, а квантовый выход замедленной флуоресценции достигает 0,2–0,4 [147,148]. Кроме того, ТБФЦ эффективно акцептирует энергию молекул $^1\text{O}_2$, образующихся без освещения при термическом разложении эндопероксидов [149].

В работе [150] мы показали, что измерение замедленной флуоресценции ТБФЦ можно использовать для исследования тушения $^1\text{O}_2$ биологически важными молекулами. Особенность этого метода состоит в том, что константа скорости тушения, полученная этим методом, ровно в 2 раза больше реальной.

В серии последующих работ нами был разработан критерий (критерий λ) эффективности возбуждения молекул красителей двумя молекулами $^1\text{O}_2$, который позволяет проводить тестирование относительной способности разных красителей к этому эффекту, исследовать влияние среды и прочих факторов [151–153]. Используя этот критерий, в последнее время мы показали, что замедленную флуоресценцию эффективно излучают некоторые водорастворимые фталоцианины в водной среде [154].

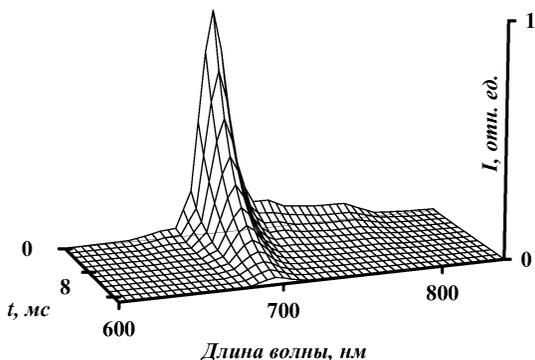


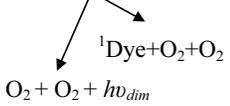
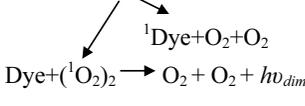
Рис. 10. Трехмерная диаграмма, показывающая зависимость спектра замедленной флуоресценции тетра(4-*трет.*-бутил) фталоцианина от времени после лазерной вспышки в насыщенном воздухе дейтерированном бензоле. Щель монохроматора соответствовала 8 нм. Кривые получены в результате суммирования сигнала от 10^5 лазерных вспышек [131]

Механизм фотолюминесценции димолей ($^1\text{O}_2$)₂ и индуцированной $^1\text{O}_2$ замедленной флуоресценции красителей является предметом дискуссии. Наиболее вероятны три альтернативные схемы, суммированные в табл. 3. Согласно одной, возбужденные молекулы димолей ($^1\text{O}_2$)₂ при соударении с молекулами красителей либо сами излучают энергию, либо передают ее молекуле красителя [144–147]. Согласно другой, возбуждение молекул красителей – результат соударения $^1\text{O}_2$ с эксиплексом, образованным при взаимодействии красителей с $^1\text{O}_2$ [155, 156]. Третий вариант состоит в том, что в результате столкновения молекул $^1\text{O}_2$ и красителя происходит образование триплетных молекул красителя, которые затем рекомбинируют с молекулами $^1\text{O}_2$ [155, 156]. Возможно, что все эти механизмы работают параллельно, а вклад каждого из них зависит от свойств красителя, природы среды и других факторов. Нужно отметить, однако, что механизм 2 является наиболее универсальным и согласуется со всеми известными в настоящее время экспериментальными данными и поэтому, по мнению автора, заслуживает особого внимания.

В итоге, несмотря на некоторую неопределенность в механизме свечения, очевидно, что измерение замедленной флуоресценции фталоцианинов и нафталоцианинов может служить исключительно чувствительным оптическим методом регистрации и исследования $^1\text{O}_2$ в фотоиндуцированных и темновых химических и биохимических процессах. Следует также отметить, что, как показано в наших экспериментах, многие соединения, включая порфирины и феофитины, способны приводить к суммированию энергии двух молекул синглетного кислорода с после-

дующей ее излучательной дезактивацией. Не исключено, что это общее свойство всех соединений, имеющих относительно протяженные пи-связи.

Таблица 3. Механизмы люминесценции, обусловленной суммированием энергии двух молекул синглетного кислорода

| Механизм 1 | Механизм 2 | Механизм 3 |
|--|--|--|
| ${}^1\text{O}_2 + {}^1\text{O}_2 \rightarrow ({}^1\text{O}_2)_2$ $({}^1\text{O}_2)_2 + \text{Dye}$  ${}^1\text{Dye} + \text{O}_2 + \text{O}_2$ $\text{O}_2 + \text{O}_2 + h\nu_{dim}$ | ${}^1\text{O}_2 + \text{Dye} \rightarrow ({}^1\text{O}_2 \dots \text{Dye})^*$ $({}^1\text{O}_2 \dots \text{Dye})^* + {}^1\text{O}_2$  ${}^1\text{Dye} + \text{O}_2 + \text{O}_2$ $\text{Dye} + ({}^1\text{O}_2)_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}_2 + h\nu_{dim}$ | ${}^1\text{O}_2 + \text{Dye} \rightarrow {}^3\text{Dye} + \text{O}_2$ ${}^3\text{Dye} + {}^1\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{Dye} + \text{O}_2$ |

$h\nu_{dim}$ – излучение димолей (${}^1\text{O}_2$)₂

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных исследований, грант No 04-03-32223а.

Литература

1. Raab O. // Z. Biol. (Muenich). 1900. В. 39. P. 524–546.
2. Tappeiner H. // Muench. Med. Wochenschr. 1900. В. 47. P. 5–7.
3. Ledoux-Lebard A. // Ann. Inst. Pasteur. 1902. V.16. P. 587–594.
4. Tappeiner H. and Jodlbauer A. // Deut. Arch. Klin. Med.. 1904. В. 80. S. 427.
5. Straub W. // Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 1904. В. 51. S. 383–390.
6. Blum H.F. // Photodynamic action and diseases caused by light. N.Y.: Hafner Publishing Company. 1964.
7. Spikes J. D. // J. Photochem. Photobiol. B. 1991. V. 9. S. 369–371.
8. Spikes J.D. // Photochem. Photobiol. 1997. V. 65S. P. 142S–147S.
9. Владимиров Ю.А. // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. Вып. 5. С. 517–529.
10. Krasnovsky. A.A. Jr., Litvin F.F. // Photochem. Photobiol. 1974. V. 20. Вып. 1. P. 133–149.
11. Evans D.F. // Chem. Comm. 1969. P. 367–368.
12. Matheson I.B.C., Lee J. // Chem. Phys. Lett. 1970. V. 7. P. 475–476.
13. Singh A., Koroll G.W., Antonsen S.A. // J. Photochem. 1984. V. 25. P. 99–104.
14. Красновский А.А., мл., Дроздова Н.Н., Иванов А.В., Амбарцумян Р.Ф. // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 9. С. 1178–1182.
15. Krasnovsky A.A., Jr., Ambartzumian R.F. // Chem. Phys. Lett. 2004. V. 400. P. 531–535.

16. Asada K., Takahashi M. // *Photoinhibition* / Ed. Kyle D.J., Osmond C.B., Arntzen C.J., Amsterdam. Elsevier. 1987. P. 227–287.
17. Asada K. // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 1999. V. 50. P. 601–639.
18. Красновский, А.А., мл. // *Биофизика*. 1994. Т. 39. Вып. 2. С. 236–250.
19. Krasnovsky, A.A., Jr. // *Proc. Roy. Soc., Edinburgh*. 1994. V. 102B. P. 219–235.
20. Иванов В.Б. // *Биохимия*. 1998. V. 63. P. 165–170.
21. Островский М.А., Федорович И.Б., Донцов А.Е. // *Биофизика*. 1987. Т. 32. Вып. 5. С. 896–908.
22. Roberts J.E. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2001. 64. No2–3. 136–143.
23. Boulton M., Rozanovska M., Rozanowski B. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2001. 64. No 2–3. 144–161.
24. Островский М.А. // *Клиническая физиология зрения*/ 2002. Научно-медицинская фирма МБН. Москва. С. 38–69.
25. Briviba K. Klotz L.O. Sies H. // *Biol. Chem.* 1997. V. 378. No 11. P. 1259–1265.
26. Klotz L.O. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. P. 443–456.
27. Klotz L.O., Kronke K-D., Sies H. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2003. V. 2. P. 88–94.
28. Кару Т.Й. // *Успехи совр. биол.*, 2001. Т. 121. С. 110–120.
29. Klebanov, G.I., Poltanov, E.A. // *Laser Physics*, 2003. V. 13. P. 1–14.
30. Владимиров Ю.А., Клебанов Г.И., Борисенко Г.Г., Осипов А.Н. // *Биофизика*. 2004. Т. 49. вып. 2. С. 339–350.
31. Владимиров Ю.А., Осипов А.Н., Клебанов Г.И. // *Биохимия*. 2004. вып. 1. С. 103–113.
32. Ambartzumian R.V. // *Proc. SPIE*. 1987. V. 701. P. 341–343.
33. Захаров, С.Д., Иванов, А.В. // *Квант. электроника*. 1999. Т. 29. С. 192–214.
34. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. // *Российский Химический Журнал*. 1998. Т. 62. С. 5–9.
35. Weishaupt R., Gomer J., Dougherty T.J. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1993. V. 85. P. 443–456.
36. Странадко, Е.Ф., Иванов А.В. // *Биофизика*. 2004. Т. 49. No 2. С. 380–383.
37. Devasagayam T.P.A., Steenken S., Obendorf M.S.V., Shultz W.A., Sies H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 30. P. 6283–6289.
38. Kraus G.A., Zhang W., Fehr J., Petrich J.W., Wannmuehler Y., Carpenter S. // *Chem. Rev.* 1996. V. 96. P. 523–535.
39. Smetana E., Ben-Hur, E. Mendelson, S. Salzberg, Wagner P., Malik Z. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 1998. V. 44. No 1. P. 77–83.

40. Rebeiz C.A., Montazer-Zouhoor A., Hopen H. J., Wu S.M. // *Enzyme Microb. Technol.* 1984. V. 6, No 9. P. 390–401.
41. Pitts J.N., Jr. // *Ann. NY Acad. Sci.* 1970. V. 171. P. 239–273.
42. Haag W.R., Hoigné J., Gassmann E., Braun A.M. // *Chemosphere.* 1984. V.13. No 5/6. P. 641–650.
43. Schenck G.O., Koch E. // *Z. Electrochem.* 1960. B. 64. S. 170–177.
44. Gollnick K., Schenck G.O. // *Pure Appl. Chem.* 1964. V. 9. No 4. P. 507–525.
45. Foote C.S. // *Photochem. Photobiol.* 1991. V. 54. P. 659.
46. Vassil'ev, R.F. // *Progr. Reaction Kinetics.* 1967. V. 4. P. 305–352.
47. Russell G.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1975. V. 97. P. 3871–3877.
48. Vladimirov Yu. A., Olenev V.I., Suslova T.V., Cheremisina Z.V. // *Adv. Lipid Res.* 1980. V.17. No 1. P. 173–249.
49. Красновский А.А. // *Докл. АН СССР.* 1948. Т. 60. С. 421–424.
50. Красновский А.А. // *Успехи химии.* 1960. Т. 29. С. 736–759.
51. Krasnovsky A.A. // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1960. Т. 11. P. 363–410.
52. Terenin A. N. // *Acta Phisicochim. (USSR).* 1943. V. 18. No 4. P. 210–241.
53. Теренин А.Н. // *Журн. Физ. Химии.* 1944. Т. 17, С. 1–12.
54. Теренин А.Н. // *Фотоника молекул красителей Л.*: Наука. 1967.
55. Mehler A.H. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1951. V. 33. No 1. P. 65–89.
56. Dufraisse C., E Cary S. // *Compt. Rend.* 1946. V. 223. P. 735–737.
57. Schonberg A. // *Liebigs Ann. Chem.* 1935. B. 518. S. 299–302.
58. Mulliken R.S. // *Nature.* 1928. V. 122. No 3075. P. 505.
59. Mulliken R.S. // *Phys. Rev.* 1928. V. 32. No 6. P. 880–887.
60. Ellis J. M., Kneser H.O. // *Z. Physik.* 1933. B. 86. No 3. S. 583–591.
61. Herzberg G. // *Nature.* 1934. V. 133. P. 759.
62. Kautsky H., de Bruin H. // *Naturwiss.* 1931. B. 19. H. 52. S. 1043.
63. Kautsky H., de Bruin H., Neuwirtch R., Baumeister W. // *Chem. Ber.*, 1933, B. 66. S. 1588–1600.
64. Kautsky H. // *Trans. Farad. Soc.* 1939. V. 35. P. 216–219.
65. Rosenberg J.L., Shombert D.J. // *J. Amer. chem. Soc.* 1960. V. 82. P. 3527–3261.
66. Schnuriger B., Bourdon J., Bedu J. // *Photochem. Photobiol.* 1968. V. 8. No 5. P. 361–368.
67. Бобровский А.П., Холмогоров В.Е. // *Химия высоких энергий.* 1972. Т. 6. No 2. С. 125–130.
68. Weiss J. // *Naturwiss.* 1935. H. 34, S. 610.
69. Franck J, Livingston R. // *J. Chem. Phys.* 1941. V. 9. P. 184–190.
70. Теренин А.Н., Ермолаев В.Л. // *Докл. АН СССР.* 1952. Т. 85. № 3. С. 547–550.

71. Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.В., Шахвердов Т.А. // Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. Л.: Наука. 1977.
72. Schenk G.O. // Z. Electrochem. 1951. В. 55. Н. 6. S. 505–511.
73. Bowen E.J. // Disc. Farad. Soc. 1953. No 14. P. 143–146.
74. Kopecky R., Reich H.R. // Can. J. Chem. 1965. V. 43. No 8. P. 2265–2270.
75. Foote C. S., Wexler S. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. No 18. P. 3880–3881.
76. Foote C. S., Wexler S. // J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. No 18. P. 3879–3880.
77. Corey E.J., Taylor W.C. // J. Amer. chem. Soc. 1964. V. 86. No 18. P. 3881–3882.
78. Khan A.U., Kasha M. // J. Chem. Phys. 1963. V. 39. No 8. P. 2105–2106.
79. Arnold S.J., Ogryszlo E.A., Witzke H. // J. Chem. Phys. 1964. V. 40. No 6. P. 1769–1770.
80. Foote C.S., Denny R.W., Weaver L., Chang Y., Peters J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1970. V. 171. No 1. P. 139–148.
81. Snelling D.R. // Chem. Phys. Lett. 1968. V. 2. No 5. P. 346–348.
82. Kearns D.R., Khan A.U., Duncan C.K., Maki A.H. // J. Am. Chem. Soc. 1969. V. 91. No 4. P. 1038–1040.
83. Wasserman E., Kuck V.J., Delavan W.M., Yager W.A. // J. Am. Chem. Soc. 1969. V. 91. No 4. P. 1040–1041.
84. Andrews L.J., Abrahamson E.W. // Chem. Phys. Lett. 1971. V. 10. No 2. P. 113–116.
85. Duncan K., Kearns D.R. // J. Chem. Phys. 1971. V. 55. No 12. P. 5822–5823.
86. Красновский А.А. мл. // Биофизика. 1976. Т. 21. No 4. С. 748–749.
87. Красновский А.А. мл. // Биофизика, 1977. Т. 22. No 5. С. 927–928.
88. Красновский А.А. мл. // Изв. АН СССР, сер. физ. 1978. Т. 41. No 2. С. 343–348.
89. Красновский А.А. мл., Каган В.Е. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 242. вып. 1. С. 229–232.
90. Красновский А.А. мл., Венедиктов Е.А. // Биофизика. 1978. Т. 23. вып. 2. С. 387–389.
91. Krasnovsky A.A. Jr. // Photochem. Photobiol. 1979. V. 29. No 1. P. 29–36.
92. Krasnovsky A.A. Jr., Kagan V.E. // FEBS Lett. 1979. V. 108. No 1. P. 152–154.
93. Бытева И.М., Гуринович Г.П., Избавителев С.П. // Журн. прикл. спектр. 1978. 29. No 1. С. 156–158.
94. Khan A.U., Kasha M. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1979. V. 76. No 12. P. 6047–6049.

95. Фут Х. // Свободные радикалы в биологии. / Ред. У.А. Прайор – М.: Мир - 1979. Т. 2. С. 96–150.
96. Foote, C.S. // Singlet oxygen / Ed. by. H.H. Wasserman, R.W. Murray, N.Y. Acad. Press. 1979. P. 139–171.
97. Foote C.S. // Biochemical and Clinical Aspects of oxygen / Ed. by W.S. Caughey. N.Y. Acad. Press. 1979. P. 603–626.
98. Davidson J., Ogryzlo E.A. // Chemiluminescence and Bioluminescence. / Ed. by D.M. Hercules, J. Lee. N.Y.: Plenum Press. 1973. P. 111–126.
99. Красновский А.А. мл. // Итоги Науки и Техники. Современные проблемы лазерной физики / Ред. С.А. Ахманов, В.Б. Черняева. М. ВИНТИ. 1990. Т. 3. С. 63–135.
100. Scurlock R.D., Wang B., Ogilby P.R. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 388–392.
101. Bodesheim M., Schmidt R. // J. Phys. Chem. 1997. V. 101. No 31. P. 5672–5677.
102. Lindig B.A., Rodgers M.A.J. // Photochem. and Photobiol. 1981. V. 33. No 5. P. 627–634.
103. Foote C.S., Clennan E.L. // Active oxygen in Chemistry/ Ed. C.S. Foote, J.S. Valentine, J.S., Greenberg, A. and Lieberman, J.L., Eds., Glasgow, Blackie Academic and Professionals, 1995, pp. 105–140.
104. Wilkinson F., Helman W.P., Ross A.B. // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1995. V. 24. No 2. 663–1021.
105. Gorman A.A. // Advances in Photochemistry/ Ed. D. Volman, G. Hammond, D. Neckers. 1992. V. 17. P. 217–274.
106. Lion Y., Delmelle M., van de Vorst A. // Nature. 1976. V. 263. No 5576. P. 442–443.
107. Nardello V., Brault D., Chavalle P., Aubry J-M. // J. Photochem. Photobiol. B. 1997. V. 39. No 2. P. 146–155.
108. Merkel P.B., Kearns D.R. // Chem. Phys. Lett. 1971. V. 12. No1. P. 120–121.
109. Merkel P.B., Kearns D.R. // J. Am. Chem. Soc. 1972. V. 94. No21. P. 7244–7253.
110. Kujiwara T., Kearns D.R. // J. Am. Chem. Soc. 1973. V. 95. No 18. P. 5886–5890.
111. Kearns D.R. // Singlet oxygen / Ed. by. H.H. Wasserman, R.W. Murray, N.Y. Acad. Press. 1979. P. 115–137.
112. Шляпинтох В.Я., Иванов В.Б. // Усп. химии. 1976. Т.45. С. 202–203.
113. Krinsky N.I. // Oxygen radicals in chemistry and biology/ Ed. W. Bors, M. Sarah, D. Tait. Berlin: Walter de Gruyter Co. 1984. P. 453–464.
114. Packer J.E., Mahood J.S., Mora-Arrelano V.O. et al. // Biophys. Biochem. Res. Commun. 1981. V. 98. P. 901–906.

115. Салохиддинов К. И., Бытева И. М., Джагаров Б. М. // Оптика и спектроскопия. 1979. Т. 47. № 5. С. 881–886.
116. Byteva I. V., Gurinovich G. P. // J. Luminescence. 1979. V. 21. P. 17–20.
117. Rodgers M. A. J., Snowden P. T. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. No. 20. P. 5541–5543.
118. Hurst J. R., McDonald J. D., Schuster C. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. No 7. P. 2065–2068.
119. Ogilby P. R., Foote C. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. No 7. P. 2069–2070.
120. Parker J.D., Stanboro W.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2067–2069.
121. Keene J.P., Kessel D., Land E.J., Redmond R.W., Truscott T.G.// Photochem. Photobiol. 1986. V. 43. No 2. P. 117–120.
122. Егоров С.Ю., Красновский А.А., мл. // Биофизика. 1983. V. 28. No3. P. 497–498.
123. Krasnovsky A.A. Jr., Egorov S.Yu., Nasarova O.V., Yartsev E.I., Ponomarev G.V. // Studia biophys. 1988. V.124. No 2-3. P. 123–142.
124. Egorov, S.Yu. and Krasnovsky A.A. Jr. // SPIE Proceedings. 1990. V. 1403. P. 611–621.
125. Егоров, С. Ю., Зинуков, С. В., Камалов В. Ф. и др. // Оптика и спектроскопия. 1988. Т. 65. № 4. С. 899–903.
126. Egorov S. Yu., Kamalov V. F., Koroteev N. I. et al. // Chem. Phys. Lett. 1989. V. 163. No. 5. P. 421–424.
127. Зинуков С. В., Камалов В. Ф., Коротеев Н. И., Красновский А. А. мл. // Оптика и спектроскопия. 1991. Т. 70. № 4. С. 790–794.
128. Красновский А. А., мл. // Биологические мембраны. 1998. Т 15. № 5. С. 531–549.
129. Krasnovsky A.A., Jr. // Membr. Cell Biol. 1998. V.12. No 5. P. 665–660.
130. Буторина Д.Н., Красновский А.А, мл., Приезжев А.В. // Биофизика. 2003. Т. 48. Вып. 2. С. 201–209.
131. Красновский А.А. // Биофизика. 2004. Т. 49. Вып. 2. С. 305–321.
132. Shimizu O., Watanabe J., Imakubo K. // J. Phys. Soc., Japan. 1997. V. 66. P. 268–269.
133. Kliger R., Maier M., Szeimies R.-M., Baemler W. // Chem. Phys. Lett. 2001. V. 343. P. 543–548.
134. Niedre M., Patterson M.S., Wilson B.C. // Photochem. Photobiol. 2002. V. 75. P. 382–391.
135. Zeber, I., Snyder, J.W., Andersen, L.K., Poulsen, L., Gao, Z., Lamber, J., Kristiansen, U. and Ogilby, P.R., Photochem. Photobiol., 2004, vol. 79, No 5, pp. 319–322.
136. Dëdic R., Svoboda A., Pšenčik J., Hála J. // J. Mol. Struct. 2003. V. 651-653. P. 301–304.

137. Лосев А. П., Бытева И. М., Гуринович Г. П. // Хим. физика. 1989. Т. 8. № 6. С. 732–739.
138. Schmidt R. // Chem. Phys. Lett. 1988. V. 151. No. 4,5. P. 369–374.
139. Schmidt R., Brauer H.-D. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. No. 23. P. 6976–6981.
140. Butorina D.N., Bashtanov M.E., Krasnovsky A.A., Jr., Prieszev A.V. // Proceedings SPIE. 2000. V. 4001. P. 385–389.
141. Красновский А.А. // Успехи биохимии. 1999. V. 39, С. 255–288.
142. Snyder J.W., Skovsen E., Lambert J.D.C., Ogilby P. // J. Amer. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 14559.
143. Bilski, P., Daub, M.E. and Chignell, C.E., Methods of Enzymol., Part A. 2002, vol. 352, pp. 41–52.
144. Красновский А.А. мл., Неверов К.В. // Биофизика. 1988. Т. 23. No 5. С. 884–885.
145. Krasnovsky, A.A., Jr., Neverov, K.V. // Chem. Phys. Lett. 1990. V. 167. No6. P. 591.
146. Неверов К.В., Красновский А.А. мл. // Оптика и спектроскопия. 1991. Т. 71. No 1. P. 105–110.
147. Krasnovsky A. A., Jr., Foote C. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. N. 14. P. 6013–6016.
148. Красновский А.А., Ю. Фу, М.Е. Баштанов, С. Мерфи, К.С. Фут // Оптика и спектроскопия. 1997. Т. 83. No 4. P. 616–620.
149. Fu Yu., Krasnovsky A.A. Jr., Foote C.S. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. No 22. P. 10282–10285.
150. Fu Yu., Krasnovsky, A.A., Jr., Foote // J. Phys. Chem. A. 1997. V.101. P. 2552–2554.
151. Баштанов М.Е., Красновский А.А. мл. // Квантовая электроника 1999. Т. 26. No 2. С. 163–167.
152. Баштанов М.Е., Дроздова Н.Н., Красновский А.А. мл. // Квантовая электроника. 1999. Т. 29. No 3. С. 230–234.
153. Krasnovsky, A.A., Jr., Schweitzer, C., Leismann, H., Tanielian, C. and Luk'yanets E.A., Quantum Electronics, 2000, vol. 30, No 5, pp. 445–448.
154. Красновский А.А. мл, Баштанов М.Е., Дроздова Н.Н., Южакова О.А., Лукьянец Е.А. // Квантовая электроника, 2002, 32, No 1, 83–86.
155. Baigel D.M., Gorman A.A., Hamblett I., Hill T.J. // J. Photochem. Photobiol. B. 98. V. 43. P. 229–231.
156. Murphy S., Kondo K., Foote C.S. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V.121. P. 3751–3755.