

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ЗАМЕДЛЕННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЭРИТРОЗИНА В ТКАНЯХ МЫШЕЙ IN VITRO

Легута С.Н., Пашкевич С.Н., Чакак А.А.,
Муханова А.Ф., Сокабаева С.С., Ишемгулов А.Т.
Оренбургский государственный университет, г. Оренбург

Одной из основных реакций фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей является перенос энергии от триплет-возбужденных зондов (сенситизаторов синглетного кислорода, СК), внедряемых в биологические ткани, на молекулярный кислород. В ряде случаев взаимодействие образуемого СК с другим триплетным возбуждением (так называемая синглет-триплетная аннигиляция, СТА) сопровождается замедленной флуоресценцией (ЗФ) зонда. Регистрация этого излучения позволяет получить ценную информацию о динамике и эффективности ФДТ [1–5]. Для количественной оценки содержания подвижного кислорода в облучаемой ткани данный подход может стать альтернативой существующим методикам, которые в целом можно разделить на две группы. К первой группе относятся методики, предлагающие измерение свечения СК [6, 7]. К сожалению, детектирование фосфоресценции СК на 1270 нм в биологических системах затруднено из-за выраженного тушения и низкой эффективности приёмников в инфракрасной области. Вторую группу образуют методы, основанные на регистрации свечения собственно сенситизатора [6, 8]. Обычно считается, что чем больше концентрация кислорода, тем сильнее тушение люминесценции зонда. Однако, помимо кислорода, часто приходится учитывать множество других факторов, оказывающих влияние на параметры свечения зонда, поэтому методы второй группы позволяют судить о динамике концентрации СК лишь опосредованно. При использовании СТА объединяются преимущества обоих подходов: свечение, обусловленное реакцией с участием СК, можно наблюдать в видимом диапазоне. Таким образом, предоставляется возможность мониторинга содержания кислорода в ткани и оценки эффективности ФДТ в режиме реального времени.

Исследованы ткани мышечной линии BYRB, у самок которых на 8 – 10 месяце с высокой вероятностью образуются специфические однотипные злокачественные опухоли молочных желёз [9]. Лабораторные животные разводились в обычных условиях содержания. Окрашивание производилось путём погружения биологического материала в водный раствор эритрозина исходной концентрации 10^{-3} моль/л. Эритрозин известен в гистологии как краситель, подсвечивающий внеядерные структуры клеток и тканей [10]. Его замедленная люминесценция представлена двумя яркими полосами: ЗФ с максимумом на 565 нм и фосфоресценция на 690 нм.

В наших экспериментах источником возбуждения служил импульсный твердотельный YAG:Nd³⁺ лазер. Кинетика длительной люминесценции регистрировалась с помощью ФЭУ-84 с управляющим электродом. Возбуждение осуществлялось второй гармоникой лазера (532 нм) в режиме серии лазерных импульсов мощностью накачки 10–15 МВт и длительностью

15 нс, следующих с заданной частотой. Все измерения производились при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении. Продолжительность времени между операцией на животном и завершением эксперимента не превышала 1,5 часа.

Изучение замедленной люминесценции зондов в биологических тканях мышей показало, что основной вклад в ЗФ на первых 10 мкс после короткого импульсного возбуждения дают процессы СТА [1, 2, 4]. Данное обстоятельство позволяет выделить СТА-зависимую составляющую на фоне общего сигнала.

При исследовании затухания ЗФ эритрозина в биологических тканях при возбуждении с периодом в несколько секунд наблюдается вполне ожидаемое совпадение всех кинетических кривых, регистрируемых после каждого возбуждения. Однако при облучении тканей с большей частотой (5 – 10 Гц) картина меняется. В ходе первых 4 – 5 импульсов СТА-составляющая ЗФ испытывает заметное тушение (рисунок 1). «Потушенные» кривые сохраняют свой вид, пока действует заданный режим возбуждения. При прекращении лазерного облучения первоначальный вид затухания ЗФ восстанавливается за 3 – 5 секунд. Отсюда следует, что описанное тушение ЗФ не является результатом фотообесцвечивания эритрозина.

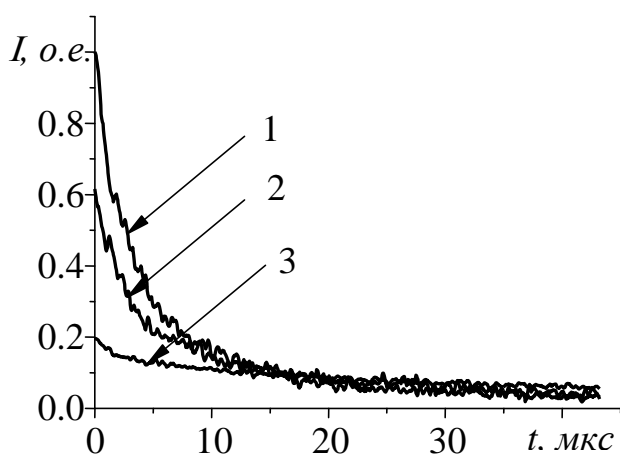


Рисунок 1 – Кинетика ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши после первого (1) и седьмого (2) возбуждающих импульсов, следующих с частотой 5 Гц. Для сравнения показана кинетика ЗФ эритрозина в той же ткани в атмосфере азота (3)

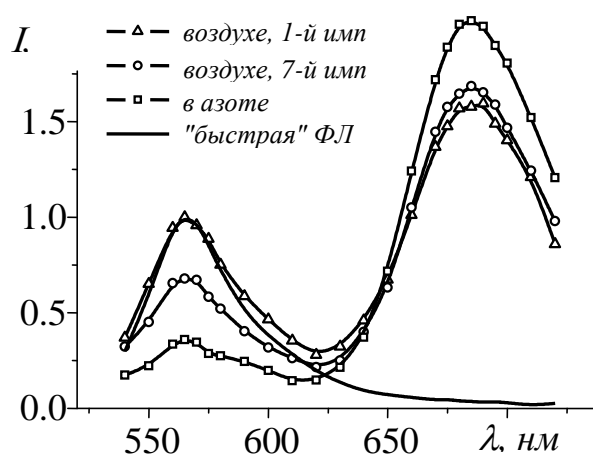


Рисунок 2 – Замедленная люминесценция эритрозина в опухоли молочной железы мыши: на воздухе (после первого и седьмого возбуждающих импульсов), а также при инкубации в азоте (ЗЛ в азоте). Сплошная линия - спектр "быстрой" флуоресценции

Эффективность тушения увеличивается с ростом частоты возбуждения или энергии накачки лазера. Характер тушения ЗФ эритрозина во многом соответствует картине, наблюдаемой при принудительном обескислороживании ткани [1–2] (пропускании газообразного азота через камеру с образцом), когда регистрируется постепенное исчезновение СТА-составляющей сигнала, – эффект заметен на начальном участке примерно до 10 мкс, длительность свечения постепенно увеличивается, тушение полностью обратимо. Отсюда можно заключить, что при лазерном возбуждении

окрашенных тканей происходит расход содержащегося в ткани свободного молекулярного кислорода, убыль концентрации которого достаточно медленно компенсируется. В отсутствие кровотока в исследуемых тканях единственным источником такого рода компенсации является атмосфера над образцом.

Мы полагаем, что расход молекулярного кислорода в ткани при наличии большого количества триплетных возбуждений объясняется образованием СК, вступающего в необратимые химические реакции с компонентами тканей. Диффузия кислорода из атмосферы, судя по данным эксперимента, способна поддерживать его концентрацию при сравнительно редком возбуждении – раз в 3 – 5 секунд. При более частом возбуждении количество кислорода и генерируемого СК в ткани постепенно снижается, что отражается в изменении кинетики затухания ЗФ.

Рассмотренное тушение СТА-составляющей ЗФ при частоте возбуждения 5 – 10 Гц наблюдается преимущественно в опухолях и практически не регистрируется в контрольных образцах молочной железы. Возможным объяснением может быть то, что в одинаковых условиях опухолевые ткани накапливают больше сенсibilизатора, чем здоровые [5]. В результате интенсивность фотодинамического образования и расходования СК будет выше в малигнанных образцах. Данный факт позволяет по наличию тушения ЗФ в определённых условиях судить о злокачественном характере ткани. Если тушение ЗФ при периодическом возбуждении будет обнаружено *in vivo*, это позволит разработать новый метод диагностики новообразований.

Уменьшение концентрации кислорода и тушение ЗФ сопровождаются незначительным увеличением выхода фосфоресценции (рисунок 2). Сравнивая амплитуды изменения ЗФ и фосфоресценции, можно сделать вывод, что некоторое уменьшение или увеличение концентрации СК удобнее оценивать с помощью ЗФ: изменения в этой полосе наиболее выражены. Таким образом, регистрация СТА-зависимой ЗФ имеет преимущество перед методами, предполагающими измерение фосфоресценции зонда [5, 6, 8].

Обнаруженный эффект позволяет оценивать количество расходуемого СК в облучаемых биологических тканях [1]. Использование кислородозависимой ЗФ, обусловленной СТА, является перспективным в медицинской диагностике и фотодинамической терапии.

Список литературы

1. *Letuta S.N. Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry / S.N. Letuta, S.N. Pashkevich, A.T. Ishemgulov, Yu.D. Lantukh, E.K. Alidzhanov, S.S. Sokabaeva, V.V. Bryukhanov // Photochem. Photobiol. B: Biology. – 2016. – Vol. 163. – P. 232–236.*
2. *Letuta S. N. Features of the delayed fluorescence kinetics of exogenous fluorophores in biological tissues / S. N. Letuta, A. F. Kuvandykova, S. N. Pashkevich, A.M. Saletskii // Russ. J. of Phys. Chem. A. – 2013. – Vol. 87. – P. 1582–1587.*

3. Кучеренко, М.Г. *Кинетика нелинейных фотопроцессов в конденсированных молекулярных системах* / М.Г. Кучеренко. – Оренбург: Изд. ОГУ, 1997. – 386 с. – ISBN 5-7410-0308-7.
4. Летуа, С.Н. *Флуоресцентная дозиметрия в фотодинамической терапии* / С.Н. Летуа, А.Т. Ишемгулов, С.Н. Пашкевич, Ю.Д. Лантух, Э.К. Алиджанов, С.С. Сокабаева // *Вестник ОГУ*. – 2015. – № 13 (188). – С. 175–180.
5. Узденский, А.Б. *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии* / А.Б. Узденский. – СПб.: Наука, 2010. – 192 с. – ISBN 978-5-02-025418-3.
6. Swartz H.M. *Measuring real levels of oxygen in vivo: opportunities and challenges* / H.M. Swartz // *Biochem. Soc. Trans.* – 2002. – Vol.30. – P. 248–252.
7. Li B. *Singlet oxygen detection during photosensitization* / B. Li, H. Lin, D. Chen, B.C. Wilson, Y. Gu // *J. Innov. Opt. Health Sci.* – 2013. – Vol. 6. – P. 1330–1332.
8. Losev A. P. *Laser detection of the interaction of a sensitizer in the triplet state with oxygen in biosystems* / A. P. Losev, V. N. Knyukshto, I. N. Zhuravkin // *J. Appl. Spectrosc.* – 1994. – Vol. 60. – P. 87–93.
9. Moiseeva E.V. *Original approaches to test antibreast cancer drugs in a novel set of mouse models* / E.V. Moiseeva. – Utrecht: Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005. – 191 p. – ISBN 90-393-4102-8.
10. Veuthey T. *Dyes and stains: from molecular structure to histological application* // T. Veuthey, G. Herrera, V.I.Dodero. – *Front. Bioscienc.* – 2014. – Vol. 19. – P. 91–112.

