

# ТУШЕНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ В ТКАНЯХ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ЭФФЕКТЕ

Летута С.Н., д-р физ.-мат. наук, профессор,  
Пашкевич С.Н., канд. физ.-мат. наук, доцент,  
Ишемгулов А.Т.,  
Алиджанов Э.К., канд. физ.-мат. наук,  
Лантух Ю.Д., канд. физ.-мат. наук, доцент,  
Раздобреев Д.А., канд. хим. наук  
Оренбургский государственный университет

## Введение

Информация о содержании кислорода в тканях живых организмов требуется при оценке состояния организма и прогнозирования хода метаболических процессов. Для получения такой информации необходимо контролировать два противоположных процесса - уменьшение количества кислорода в тканях в результате его потребления и последующее восстановление содержания кислорода до исходного уровня. Согласно современным представлениям, в клетках здоровых тканей и тканей, пораженных патологией, скорости потребления и восстановления исходной концентрации кислорода различны. Поэтому, если иметь в распоряжении метод мониторинга содержания кислорода в тканях, можно диагностировать развитие патологии на очень ранней стадии.

Динамику изменения содержания кислорода в тканях при фотодинамических процессах можно исследовать по кинетике замедленной флуоресценции эндогенных или экзогенных фотосенсибилизаторов (ФС). В качестве экзогенных ФС чаще всего используют органические красители. Замедленная флуоресценция (ЗФ) возникает в результате излучательной релаксации триплетных  $T_1$  состояний молекул. Интенсивность и продолжительность ЗФ ФС зависит от присутствия в среде тушителей  $T_1$ -состояний молекул. Эффективным тушителем триплетных состояний молекул является кислород  $^3O_2$ . В результате взаимодействия молекулы кислорода  $^3O_2$  с молекулой ФС в триплетном состоянии образуется синглетный кислород  $^1O_2$  в реакции:  $T_1 + ^3O_2 \rightarrow S_0 + ^1O_2$ . Таким образом, по известной концентрации синглетного кислорода (СК) можно в целом оценить содержание кислорода в среде. Известно, что СК отличается высокой химической активностью, что используется в фотодинамической терапии (ФДТ) [1-7]. Некоторые способы оценки эффективности генерации СК в различных средах обсуждаются в [8-21].

Количество СК в среде можно определить различными способами. Прямой способ определения концентрации  $^1O_2$  - измерение его ИК фосфоресценции:  $^1O_2 \rightarrow ^3O_2 + h\nu_{ик}$ . Но зарегистрировать стабильный сигнал фосфоресценции  $^1O_2$  в биологических системах трудно, поскольку квантовый выход собственного свечения  $^1O_2$  очень мал [11-15]. Поэтому часто используют косвенные методы, основанные на способности кислорода  $^3O_2$  тушить триплетные состояния ФС [18-22]. При этом информацию о содержании кислорода получают, исследуя тушение фосфоресценции ФС  $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{фос}$  или ЗФ  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{зф}$ , вы-

званной термической активацией обратной интеркомбинационной конверсии  $T_1 \rightarrow S_1$  в молекулах ФС.

Замедленная флуоресценция может возникать и при аннигиляции двух молекул ФС в триплетном состоянии  $T_1 + T_1 \rightarrow S_0 + S_1 \rightarrow S_0 + S_0 + h\nu$ . Однако в [4-7] показано, что молекулы красителей в тканях находятся преимущественно в связанном состоянии и вклад процесса  $T_1 + T_1$  аннигиляции в релаксацию триплетных возбуждений ФС мал.

Если молекулы кислорода в среде могут свободно перемещаться, что имеет место практически во всех биологических средах, то реализуется еще один механизм возникновения ЗФ. В [4-7] показано, что в результате взаимодействия  $^1O_2$  с оставшимися непотушенными триплетными состояниями ФС  $T_1 + ^1O_2 \rightarrow S_1 + ^3O_2$  образуются возбужденные синглетные  $S_1$  состояния ФС, которые дают дополнительный вклад в ЗФ  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{азф}$ . Процесс  $T_1 + ^1O_2$  называется синглет-триплетной аннигиляцией (СТА). Возникающую при этом люминесценцию будем называть аннигиляционной ЗФ (АЗФ). Такой тип ЗФ подробно изучен для различных молекул в неживых системах [5-11]. Известны исследования АЗФ в некоторых биосистемах, например, в одиночных комплексах ЛНСИ [9], в отдельных клетках [23] и в тканях млекопитающих [4-7].

По кинетике АЗФ можно оценить количество СК в системе. Преимущества АЗФ по сравнению с ИК фосфоресценцией  $^1O_2$  состоят в том, что эта флуоресценция наблюдается в видимой области спектра, она достаточно интенсивна и для ее наблюдения не требуется сложной системы регистрации. Кроме того, по фосфоресценции или термостимулированной ЗФ можно лишь судить о наличии в системе  $^3O_2$  кислорода, а АЗФ содержит информацию непосредственно о СК. Поэтому по кинетике АЗФ можно отслеживать динамику изменения содержания кислорода в среде и эффективность ФДТ в реальном времени, если скорость процесса  $T_1 + ^1O_2$  достаточно велика [2-4, 23].

В настоящей работе на примере тканей мышей, по кинетике АЗФ ксантеновых красителей исследована динамика изменения концентрации кислорода в среде, дана оценка фотодинамических потерь, предложена методика и определены скорости потребления и восстановления содержания кислорода в тканях.

### **Методы и объекты исследования**

Исследованы ткани мышей линии BYRB. У женских особей этой чистой линии мышей на определенном этапе их жизненного цикла спонтанно образуются злокачественные опухоли молочной железы. Фрагменты здоровых тканей и опухолей для исследований отбирались хирургическим путем. Изучены спонтанные и трансплантированные опухоли. Трансплантированные опухоли получали переносом опухолей от больных животных к здоровым подкожно.

В качестве ФС использовались ксантеновые красители - эритрозин, эозин Y, эозин B и бенгальский розовый. Красители этого типа применяются в гистологии для визуализации компонентов цитоплазмы клетки. Выбранные красители имеют высокий квантовый выход в триплетное состояние в воде, интенсивную ЗФ с максимумом в области 560-570 нм и фосфоресценцию с максимумом на 670-690 нм.

Окрашивание тканей осуществлялось путем их погружения в водный раствор красителя с концентрацией  $10^{-3}$  моль/л с последующим промыванием.

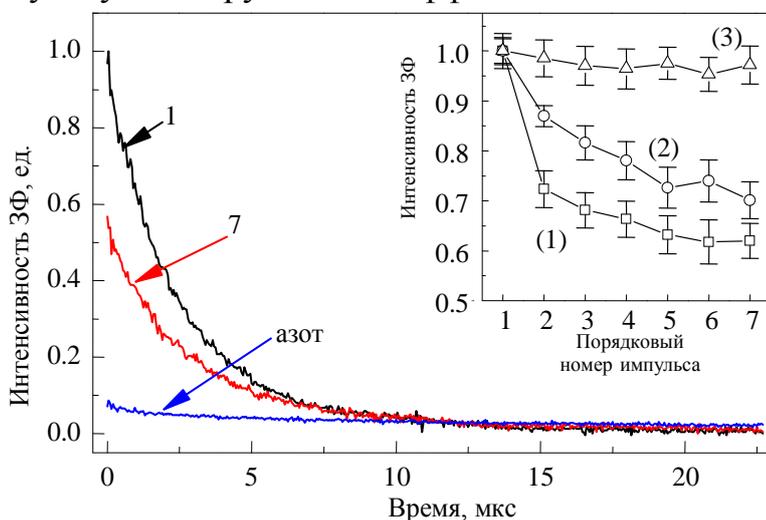
Образцы помещали в термостатируемую камеру, которая при необходимости подключалась к баллону с азотом для регулирования содержания кислорода в атмосфере над тканями. Время между операцией на животных и завершением всех экспериментов составляло не более 1 часа.

Для возбуждения молекул красителей использовалась вторая гармоника импульсного лазера YAG: Nd<sup>3+</sup> (длительность импульса 15 нс, плотность мощности возбуждения  $\sim 0,5$  МВт/см<sup>2</sup>, частота следования импульсов регулировалась в пределах 0,1 - 10 Гц.). Возбуждение производилось не одиночными импульсами, а сериями от 7 до 10 импульсов. Период между импульсами в каждой серии сохранялся постоянным, но в разных сериях, при необходимости, период изменялся от 0,1 сек до 10 сек.

Спектры ЗФ и флуоресценции красителей измерялись как зависимости площади под соответствующей кинетической кривой от длины волны. Все измерения проводились при нормальных условиях.

### 3. Результаты и их обсуждение

В ходе исследования ЗФ и флуоресценции ксантовых ФС в тканях здоровых и больных мышей при импульсно-периодическом возбуждении серией импульсов (до 10 импульсов в серии) установлены следующие закономерности. При частотах следования возбуждающих импульсов выше 1 Гц интенсивность АЗФ экзогенных красителей в тканях уменьшается от импульса к импульсу. Обнаруженный эффект назван световым тушением замедленной флуоресценции (СТЗФ).



**Рис. 1.** Кинетика ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши после 1-го и 7-го возбуждающего импульса. Нижняя кривая («азот») – ЗФ эритрозина после продувки камеры с образцами газообразным азотом. На вставке - изменение интенсивности АЗФ эритрозина (площадь под кривой ЗФ на участке 0 – 10 мкс) при возбуждении серией из 7 импульсов с частотой 10 Гц (1), 5 Гц (2) и 0,5 Гц (3).

участке кривой от 0 до 10 мкс. В отсутствие кислорода (кривая «азот» на Рис. 2) кинетика люминесценции полностью определяется термостимулированной ЗФ  $T_1 \rightarrow S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{zf}$  (ТЗФ). В присутствии кислорода к ТЗФ добав-

ляется флуоресценция (СТЗФ). В качестве иллюстрации эффекта СТЗФ на Рис. 1 показана кинетика ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши при частоте возбуждения 5 Гц. Видно, что интенсивность АЗФ красителя после 7-го импульса возбуждения почти на 40 % меньше интенсивности свечения после 1-го импульса (Рис. 2, кривые 7 и 1, соответственно).

Дезоксигенация ткани газообразным азотом приводит к существенному (и обратимому) уменьшению интенсивности ЗФ красителей на

ляется АЗФ, и поэтому происходит резкое увеличение интенсивности свечения на отрезке времени 0 – 10 мкс. На коротких временах (0 – 10 мкс) кинетика ЗФ практически полностью формируется за счет АЗФ.

Если временной интервал между возбуждающими импульсами превышает 2-3 секунды, кинетические кривые ЗФ не изменяются от импульса к импульсу, т.е. эффект СТЗФ не наблюдается.

Уменьшение интенсивности АЗФ при возбуждении серией импульсов тем заметнее, чем меньше период между импульсами и чем больше энергия импульсов возбуждения. В «длинной» серии (более 10 импульсов возбуждения) уменьшение интенсивности АЗФ достигает насыщения и перестает меняться (вставка на **Рис. 1**). Если период между импульсами возбуждения составляет 0,1 с, то интенсивность АЗФ уменьшается после 5-7 импульсов до 60 % от исходного значения.

Начальная интенсивность флуоресценции по окончании каждого импульса остается постоянной. Таким образом, начальная концентрация триплетных возбуждений ФС в тканях от импульса к импульсу не изменяется.

Интегральная интенсивность и время жизни флуоресценции красителей в тканях незначительно возрастают от импульса к импульсу. Это проявляется в спектрах длительной люминесценции. Относительное изменение интегральной интенсивности ЗФ (полоса 550 – 600 нм) намного больше, чем изменение флуоресценции (полоса 650 – 720 нм).

Эффект СТЗФ не связан с обратимыми фотохимическими реакциями или необратимым фотообесцвечиванием красителей. Об этом свидетельствуют как минимум три фактора. Во-первых, параметры люминесценции не изменяются при низкой частоте следования импульсов возбуждения. Если бы имело место фотообесцвечивание, то тушение ЗФ должно происходить при любой частоте возбуждающих импульсов. Во-вторых, в широком диапазоне спектра не обнаружены новые полосы излучения в окрашенных тканях. В-третьих, начальная интенсивность флуоресценции по окончании каждого возбуждающего импульса не меняется, поэтому исходная концентрация ФС постоянна.

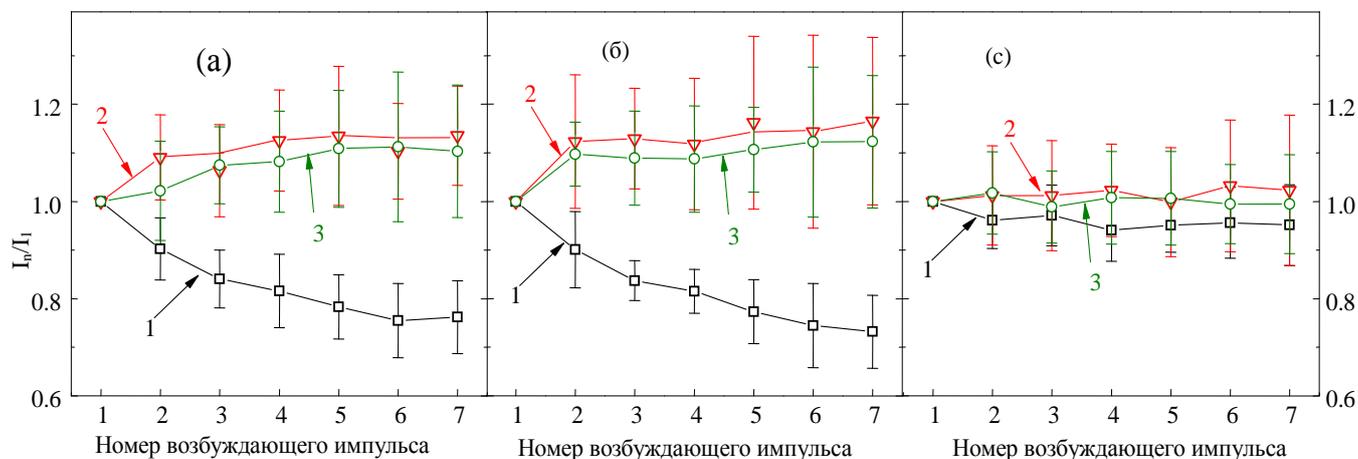
На **Рис. 2** показаны изменения интенсивностей АЗФ, ТЗФ и флуоресценции эозина в различных тканях при возбуждении серией из 7-ми импульсов. Заметное тушение АЗФ наблюдается в спонтанной (**Рис. 2 а**, кривая 1) и трансплантированной (**Рис. 2 б**, кривая 1) опухолках. В здоровой ткани (**Рис. 2 с**, кривая 1), в отличие от опухоли, интенсивность АЗФ не изменяется.

Интенсивности ТЗФ и флуоресценции красителя (**Рис. 2 а**, б, кривые 2, 3) незначительно увеличиваются в опухолках. Но в здоровых тканях изменения этих видов длительной люминесценции (**Рис. 2 с**, кривые 2, 3) остаются в пределах погрешности эксперимента.

На основании представленных экспериментальных данных можно утверждать, что эффект СТЗФ обусловлен уменьшением концентрации кислорода в области облучения ткани.

После лазерного облучения ФС в тканях генерируются активные формы кислорода, в основном синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ . СК окисляет компоненты

ткани с высокой эффективностью. Этот процесс известен как химическое тушение  $^1\text{O}_2$ . При этом образуется сильная ковалентная связь между  $^1\text{O}_2$  и субстратом. Известными мишенями для окисления  $^1\text{O}_2$  в тканях служат белки и/или ненасыщенные липиды. СК активно окисляет компоненты злокачествен-



**Рис. 2.** Изменение интенсивности ЗФ эритрозина в спонтанной (а) и трансплантированной (б) опухолях, а также в нормальной ткани (с) молочной железы мыши при импульсно-периодическом возбуждении серией из 7-ми импульсов следующих с периодом 0.2 сек. Все результаты нормированы на начальное значение. Цифрами обозначены: 1 (черный цвет) площадь под кривой ЗФ на участке 0 – 10 мкс, где доминирует АЗФ; 2 (красный цвет) площадь под кривой ЗФ на участке 20 – 50 мкс, где доминирует ТЗФ; 3 (зеленый цвет) площадь под кинетической кривой фосфоресценции на участке 20 – 50 мкс.

ных клеток, вызывая их гибель, что лежит в основе ФДТ. В результате таких химических реакций, количество кислорода в ткани уменьшается.

Химическое тушение  $^1\text{O}_2$  конкурирует с процессом СТА, поскольку за время жизни СК в ткани (десятки или сотни наносекунд) он может мигрировать на расстояние нескольких десятков нанометров, что позволяет  $^1\text{O}_2$  аннигилировать с  $T_1$ -возбуждениями ФС. Но во время этого процесса количество кислорода в ткани не изменяется, в отличие от химического тушения  $^1\text{O}_2$ .

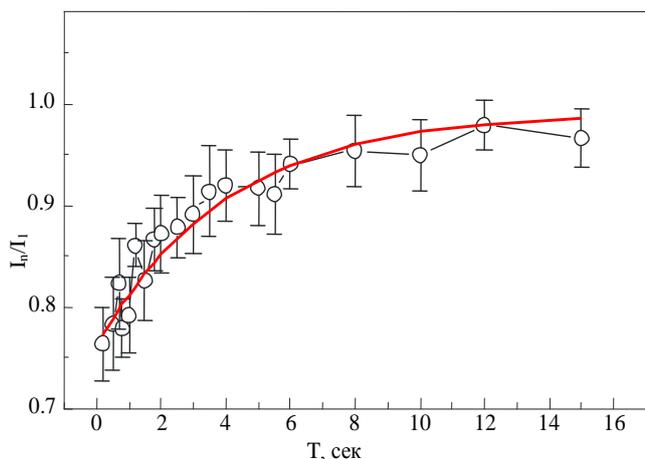
Другие каналы релаксации СК – внутренняя безызлучательная конверсия или ИК фосфоресценция также не уменьшают общего содержания кислорода  $^3\text{O}_2$  в тканях.

Таким образом, наиболее вероятно, что СТЗФ возникает в результате химического связывания  $^1\text{O}_2$  с компонентами тканей. Медленная диффузия кислорода из воздуха или кровотока в клетки ткани не может компенсировать быстрый расход кислорода при химическом связывании  $^1\text{O}_2$  с субстратом.

Если период между импульсами возбуждения в серии составлял менее 0,5 с, эффект СТЗФ красителей в опухолях молочной железы мышей наблюдался примерно в 90% экспериментов, но почти не наблюдался в тканях здоровых животных. Аналогичные результаты получены для трансплантированных опухолей.

Наиболее отчетливый эффект СТЗФ регистрировался в рыхлых опухолях. Вероятно, такие ткани содержат много воды и водорастворимые ФС легко накапливаются в них. Кроме того, СТЗФ регистрировалось в других органах больных мышей - почках и печени, где визуальное и гистологическое были обнаружены патологии. Возможно, эффект СТЗФ имеет место в тканях с различными патологиями, но у нас пока недостаточно статистики, чтобы надежно под-

твердить или опровергнуть это утверждение. В качестве противоположного примера укажем, что СТЗФ наблюдалось только в 10 % экспериментов в легких животных.



**Рис. 3** – Восстановление интенсивности ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши.

Если концентрация молекул ФС в триплетном состоянии увеличивается, то эффективность производства  $^1\text{O}_2$  растет. Следовательно, в тканях с высоким содержанием ФС вероятность обнаружения СТЗФ выше. В этом смысле опухоли являются хорошим и известным примером. Злокачественные ткани характеризуются активным анаболизмом, что приводит к росту и накоплению белка в клетках. Молекулы протеина могут одновременно служить основой для связывания ФС и химического потребления генерируемого  $^1\text{O}_2$ .

Используя эффект СТЗФ, можно определить время восстановления исходного содержания кислорода в ткани.

В результате СТЗФ интенсивность АЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши снижается почти на 50 % после возбуждения серией из 7 импульсов («1-я» и «7-я» кривые на **Рис. 5**). Экспериментально установлено, что если записать новую «контрольную» кривую ЗФ примерно через 10 секунд после окончания серии возбуждения, то она полностью совпадает с кривой ЗФ после 1-го импульса. Таким образом, для полного восстановления исходного содержания кислорода в ткани требуется не более 10 секунд. Процесс восстановления содержания кислорода в тканях можно проследить во времени, записывая «контрольные» кинетические кривые (заметим, что для записи "контрольной" кривой ЗФ используется одиночный импульс) через определенные промежутки времени после окончания серии возбуждения.

На **Рис. 3** показано восстановление интенсивности АЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши. Были записаны «контрольные» кривые ЗФ с разной задержкой контрольного импульса после окончания цикла возбуждения. Ординаты точек соответствуют площади под «контрольной» кривой ЗФ эритрозина. Сплошная кривая является приближением, построенным для простейшей модели восстановления интенсивности АЗФ. В этой модели предполагается, что скорость восстановления пропорциональна отклонению от равновесия.

Аппроксимация дает функцию:

$$I = I_0 \left( 1 - A \exp \left\{ -\frac{T}{\tau} \right\} \right)$$

где  $A \approx 0,2$ ,  $\tau \approx 4,5$  сек.

Таким образом, постоянная времени восстановления интенсивности АЗФ в поверхностном слое ткани молочной железы мыши на воздухе составляет несколько секунд. Поскольку интенсивность АЗФ пропорциональна концентрации кислорода, постоянная времени восстановления содержания кислорода в тканях также составляет несколько секунд.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, госзадание № 3.6358.2017 / 8.9.

#### Список литературы

1 Krasnovsky, A.A., Jr., *Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. History of Development and the Modern Status of Research* / A.A. Krasnovsky // *Biochemistry*. – 2007. – № 72. – С. 1065–1080.

2 Celli, J.P. *Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization* / J.P. Celli, B.Q. Spring, I. Rizvi, C.L. Evans, K.S. Samkoe, S. Verma, B.W. Pogue, T. Hasan // *Chem. Rev.* – 2010. – 110. – P. 2795–2838.

3 Liu, W. *Laser-induced fluorescence: Progress and prospective for in vivo cancer diagnosis* / W. Liu, X. H. Zhang, K.P. Liu, S.D. Zhang, Y.X. Duan // *Chinese Science Bulletin*. – 2013. – 58. – P. 2003-2016.

4 Летуца, С.Н. *Длительная люминесценция органических красителей в клетках биологических тканей* / С.Н. Летуца, В.С. Маряхина, С.Н. Пашкевич, Р.Р. Рахматуллин // *Оптика и спектроскопия*. - 2011. - Т. 110. - № 1. - С. 72-75.

5 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 // *J. Photochem. Photobiol. B*. – 2016. – 163. – P. 232–236.

6 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 // *Rus. J. Phys. Chem. A*. – 2013. – m.87. - С. 1582–1587.

7 Letuta, S.N. *The kinetics of exogenous phosphors delayed fluorescence in tissues* / S.N. Letuta, A.F. Kuvandykova, S.N. Pashkevich // *J. Anal. Oncology*. – 2012.- № 1. – P. 107–110.

8 Bryukhanov, V.V. *Singlet-triplet annihilation of singlet oxygen and triplet xanthene dye molecules in liquid solutions* / V.V. Bryukhanov, G.A. Ketsle, V.Ch. Laurinas, L.V. Levshin, Z.M. Muldakhmetov // *J. Appl. Spectr.* – 1987. – m. 46. – С. 372–377.

9 Gruber, J.M. Singlet-triplet annihilation in single LHCII complexes / J.M. Gruber, J. Chmeliov, T.P. Krüger, L. Valkunas, R. van Grondelle // *Chem. Phys.* – 2015. – V. 17. – P. 19844–19853.

10 Scholz, M. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers / M. Scholz, R. Dëdic, T. Breitenbach, J. Hála // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – № 12. – P. 1873-1884.

11 Vinklárëk, I.S. Singlet oxygen feedback delayed fluorescence of protoporphyrin IX in organic solutions / I.S. Vinklárëk, M. Scholz, R. Dëdic, J. Hála // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2016. – № 16. – P. 507–518.

12 Schlothauer, J.C. Luminescence investigation of photosensitizer distribution in skin: correlation of singlet oxygen kinetics with the microarchitecture of the epidermis / J.C. Schlothauer, J. Falckenhayn, T. Perna, S. Hackbarth, B. Röder // *J. Biomed. Opt.* – 2013. – V.18. – P. 115001.

13 Mik, E.G. Special article: measuring mitochondrial oxygen tension: from basic principles to application in humans / E.G. Mik // *Anesth Analg.* – 2013. – № 117. – P. 834–846.

14 Snyder, J.W. Singlet oxygen microscope: from phase-separated polymers to single biological cell / J.W. Snyder, I. Zebger, Z. Gao, L. Poulsen, P.K. Frederiksen, E. Skovsen, S.P. McIlroy, M. Klinger, L.K. Andersen, P.R. Ogilby // *Acc. Chem. Res.* – 2004. – № 37. – P. 894–901.

15 Dmitriev, R.I. Optical probes and techniques for O<sub>2</sub> measurement in live cells and tissue / R.I. Dmitriev, D.B. Papkovsky // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – № 69. – P. 2025–2039.

16 Li, B. Singlet oxygen detection during photosensitization / B. Li, H. Lin, D. Chen, B.C. Wilson, Y. Gu // *J. Innov. Opt. Health Sci.* – 2013. – № 6. – P. 1330002.

17 Feng, Y. Ratiometric optical oxygen sensing: a review in respect of material design / Y. Feng, J. Cheng, L. Zhou, X. Zhou, H. Xiang // *Analyst.* – 2012. – V.137. – P. 4885–4901.

18 Papkovsky, D. Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes / D. Papkovsky, A.V. Zhdanov, A. Fercher, R. Dmitriev, J. Hynes // *Briefs in Biochem. & Mol. Biol.* – Springer. – 2012.

19 You, M.X. Fluorescent detection of singlet oxygen: Amplifying signal transduction and improving sensitivity based on intramolecular FRET of anthryl appended porphyrins / M.X. You, Y.X. Wang, H. Wang, R.H. Yang // *Chinese Sci. Bull.* – 2011. – № 56. – P. 3253–3259.

20 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. Spectr.* – 1994. – № 60. – P. 71–76.

21 Wilson, D.F. Oxygen dependent quenching of phosphorescence: a perspective / D.F. Wilson // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1992. – V. 317. – P. 195–201.

22 Кучеренко, М.Г. Изменение кинетики аннигиляционной люминесценции красителей в полимерах под действием лазерного импульса / М.Г. Кучеренко, М.П. Мельник, Г.А. Кеце, С.Н. Летута // *Оптика и спектроскопия.* – 1995. – Т.78. – № 4. – С.649-653.

23 Shen, Y. *Indirect imaging of singlet oxygen generation from a single cell/*  
*Y. Shen, H. Lin, Z. Huang, D. Chen, B. Li and S. Xie // Laser Phys. Lett. – 2011. -*  
*№ 8. – P. 232–238.*