

исследования позволяют констатировать, что длительное субхроническое ингаляционно-наружное воздействие газовой смеси, содержащей синглетный кислород, на протяжении 30 суток снижает в целом про- и антиоксидантный баланс в организме животных. Спустя 60 суток после применения синглетного кислорода отмечено повышение активности СОД в эритроцитах.

Список литературы / References:

1. *Синглетно-кислородная терапия* (научно-методическое пособие). Под ред. Самосюк И.З., Фисенко Л.И. Киев: НМЦ «Мединтех», 2007, 228 с. [*Singlet-oxygen therapy* (scientific textbook). Under the edition of Samosjuk I.Z., Fisenko L.I. Kiev: NMC «Medinteh», 2007, 228 p. (In Russ.)]
2. Dufour Y.S., Landick R., Donohue T.J. Organization and Evolution of the Biological Response to Singlet Oxygen Stress. *J Mol Biol.*, 2008, vol. 383, no. 3, pp. 713-730.
3. Hwang J.Y. [et al.] Photoexcitation of tumor-targeted corroles induces singlet oxygen-mediated augmentation of cytotoxicity. *J Control Release*, 2012, vol. 163, no. 3, pp. 368-373.
4. Riethmuller M., Burger N., Bauer G. Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling. *Redox Biol.*, 2015, no. 6, pp. 157-168.
5. Павлюченко И.И., Ременякина Е.И., Панасенкова Ю.С., Ваштак И.В. Целесообразность мониторинга перекисного окисления липидов для оценки эффективности терапевтических программ в условиях санатория. *Фундаментальные исследования*, 2012, № 7, с. 151-154. [Pavljuchenko I.I., Remenjajkina E.I., Panasenikova Ju.S., Vashtak I.V. The feasibility of monitoring of lipid peroxidation for the evaluation of the effectiveness of therapeutic programs in the conditions of sanatorium. *Fundamental research*, 2012, no. 7, pp. 151-154. (In Russ.)]
6. Mihara M., Uchiyama M. *Biochemistry*. N.Y.: Med., 1980, 271 p.
7. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии*, 1999, т. 45, № 3, с. 109-116. [Sirota T.V. A new approach to the study of the process of auto-oxidation of adrenaline and use it to measure the activity of superoxide dismutase. *Voprosy medicinskoj himii*, 1999, vol. 45, no. 3, pp. 109-116. (In Russ.)]
8. Waterborg J.H., Matthews H.R. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.*, 1994, vol. 32, no. 1, pp. 1-4.
9. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*. Под ред. Крупаткина А.И., Сидорова В.В. М: Медицина, 2005, 256 с. [*Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation*. Under the edition of Krupatkina A.I., Sidorova V.V. Moscow: Medicine, 2005, 256 p. (In Russ.)]

ДЛИТЕЛЬНАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СЕНСИБИЛИЗАТОРА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА КИСЛОРОДА

Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Пашкевич С.Н.

Оренбургский государственный университет

пр. Победы, 13, г. Оренбург, 460018, РФ

e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru, letuta@com.osu.ru

Аннотация. Исследована кинетика затухания замедленной люминесценции ксантеновых зондов при варьировании уровня кислорода в биологических тканях. Показано, что значительная доля замедленной флуоресценции зонда образцов, находящихся на открытом воздухе, генерируется за счёт аннигиляции триплет-возбуждённого сенсibilизатора и синглетного кислорода (СТА-ЗФ). При снижении концентрации кислорода в тканях, в том числе и в результате фотодинамического эффекта, наблюдается тушение СТА-ЗФ. Показывается, что чувствительность СТА-ЗФ к содержанию синглетного кислорода в ткани выше, чем других видов замедленной люминесценции сенсibilизатора. Предлагается по величине интенсивности СТА-ЗФ можно отслеживать динамику кислорода в тканях в режиме реального времени. Преимущества данного подхода перед альтернативными методиками мониторинга свободного кислорода в тканях также обсуждаются.

Ключевые слова: синглетный кислород, оксигенация биологических тканей, синглет-триплетная аннигиляция, замедленная флуоресценция,

DELAYED FLUORESCENCE OF SENSITIZER IN BIOLOGICAL TISSUES WITH LOW OXYGEN TENSION

Ishemgulov A.T., Letuta S.N., Pashkevich S.N.
Orenburg State University
Pobedy av., 13, Orenburg, 460018, Russia
e-mail: azamat.ischemgulov@yandex.ru, letuta@com.osu.ru

Abstract. Delayed luminescence kinetics of xanthene dyes was investigated for biological tissues with various oxygen tensions. It was shown that a large part of sensitizer delayed fluorescence is generated through annihilation of triplet-excited sensitizer and singlet oxygen (STA-DF) when samples are in open air. If tissue oxygen tension decreases including as a result of the photodynamic effect, quenching of STA-DF is observed. It is shown that the STA-DF has higher sensitivity to singlet oxygen amount in the tissue than other types of sensitizer delayed luminescence. It is proposed to monitor the oxygen dynamics in the tissue by the magnitude of the STA-DF intensity in real time. Some advantages of this approach over alternative fluorescent techniques of tissue oxygen monitoring are discussed.

Key words: singlet oxygen, biological tissue oxygenation, singlet-triplet annihilation, delayed fluorescence

Оптические методы определения текущей концентрации кислорода в биологических клетках и тканях имеют широкие перспективы как в научных исследованиях, так и в медицинской практике. В основе таких методов, как правило, лежит внедрение в исследуемую среду специальных зондов (фотосенсибилизаторов, ФС) с последующим возбуждением и регистрацией их люминесценции. Возбуждённые триплетные состояния ФС очень эффективно взаимодействуют с молекулярным кислородом, а также являются источниками замедленной люминесценции. Метастабильные триплетные состояния ФС являются относительно долгоживущими. Так, для исследованных нами красителей время жизни составляет около 0,7 – 5 мс при отсутствии тушителей, в течение которого возможна передача энергии от ФС либо другим зондам, либо молекулярному кислороду [1-3]. В последнем случае в среде генерируется синглетный кислород (СК), обладающий собственной люминесценцией в ближней ИК-области. Различные каналы дезактивации триплетных возбуждений конкурируют между собой: при определённой концентрации кислорода в среде собственное свечение триплетных ФС (выражаемое или термоактивированной замедленной флуоресценцией (ТЗФ), или фосфоресценцией) заметно тушится. Таким образом, для оценки уровня кислорода в биологических образцах возможны различные подходы [4,5]:

- регистрация собственной ИК-фосфоресценции СК [6-8];
- оценка тушения собственной люминесценции ФС (обычно фосфоресценции) [9-11];
- использование сторонних зондов, интенсивность свечения которых зависит либо от количества непотушенного кислородом ФС, либо от количества образуемого СК [12,13];
- наблюдение свечения, обусловленного аннигиляцией триплетного возбуждения и СК (синглет-триплетная аннигиляция, СТА) [14-16].

В настоящей работе речь пойдёт об использовании замедленной флуоресценции, вызванной СТА, для оценки уровня кислорода в биологических тканях. Данное свечение регистрируется в оптическом диапазоне, его интенсивность прямо пропорциональна количеству прореагировавших молекул кислорода, а также не требует введения дополнительных зондов. СТА-ЗФ по сути является результатом двухэтапного процесса переноса энергии с одного триплетного возбуждения на другое посредством подвижного кислорода. Интенсивность СТА-ЗФ очень сильно зависит как от плотности триплетных возбуждений, так и от концентрации кислорода в ткани. Свечение СТА-ЗФ хорошо изучено для модельных небиологических объектов, однако для клеток и тканей данный вид послесвечения исследован слабо и фрагментарно. В настоящей работе представлены результаты исследования кинетики затухания СТА-ЗФ ксантеновых зондов в нативных биологических тканях в сравнении с собственной люминесценцией ФС. Особое внимание будет уделяться тканям с искусственно сниженной концентрацией кислорода, так как кинетика люминесценции в таком случае заметно меняется. Результаты данного исследования важны для понимания механизмов влияния кислорода на сигнал замедленной люминесценции, в том числе и при локальной дезоксигенации тканей, обусловленной фотодинамическим эффектом [17,18].

В качестве образцов использовались ткани, полученные от лабораторных мышей чистых линий BYRB [19] и BULB, а также от свободно скрещивающихся особей. Свежие образцы тканей (время между оперированием и завершением измерений не более 2 часов) окрашивались стандартным методом путём погружения на 2 минуты в водный раствор красителя концентрации 10^{-3} моль/л. Использованные нами ксантеновые красители (эозин, эритрозин, бенгальский розовый) обладают высоким выходом в триплетное состояние, небольшим синглет-триплетным расщеплением ($\Delta E < 3000$ см⁻¹), а также хорошо растворимы в воде и способны проникать внутрь клеток, что обуславливает их применение в гистологии. Для исследования люминесценции образцы помещались в герметичную термостабируемую камеру, к которой при необходимости подключался баллон с газообразным азотом для регулирования концентрации кислорода в атмосфере над образцами. Молекулы красителей возбуждались излучением второй гармоники ($\lambda_{\text{возб}} = 532$ нм) твердотельного YAG:Nd³⁺ лазера импульсами плотностью $P < 1$ МВт/см², длительностью по 15 нс. Кинетика длительной люминесценции регистрировалась с помощью фотоумножителя ФЭУ-84 с управляющим электродом. Замедленная люминесценция исследованных красителей наблюдается в диапазонах $\lambda = 550-579$ нм (ЗФ) и $\lambda = 650-700$ нм (ФФ). Все измерения производились при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении.

При длительном инкубировании окрашенных образцов в проточном газообразном азоте, при которой происходит дезоксигенация образцов, вид кривых затухания ЗФ зондов заметно меняется. На начальном участке кинетической кривой (ранняя кинетика, первые несколько мкс после возбуждения) наблюдается сильное тушение, в то время как на участке свыше 10 мкс (поздняя кинетика) после возбуждения интенсивность ЗФ слабо растёт (см. рис. 1, кривые 1 и 2). Форма кривой затухания ЗФ при обескислороживании образцов асимптотически приближается к моноэкспоненциальной. Кинетика затухания фосфоресценции изменяется аналогично поздней кинетике ЗФ: продолжительность и интенсивность заметно увеличиваются (см. рис. 2). Подобное изменение кинетики замедленного послесвечения полностью обратимо (при возвращении образцов на обычную атмосферу).

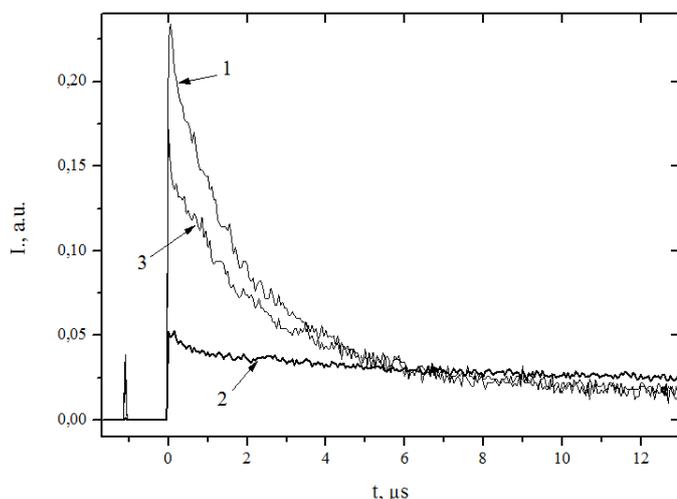


Рисунок 1 – Внешний вид ранней кинетики затухания ЗФ эритрозина в образце ткани печени лабораторной мыши. 1 – образец находится на обычной атмосфере, 2 – образец находится в атмосфере азота, 3 – образец находится на обычной атмосфере, но подвергся воздействию серии импульсов возбуждения

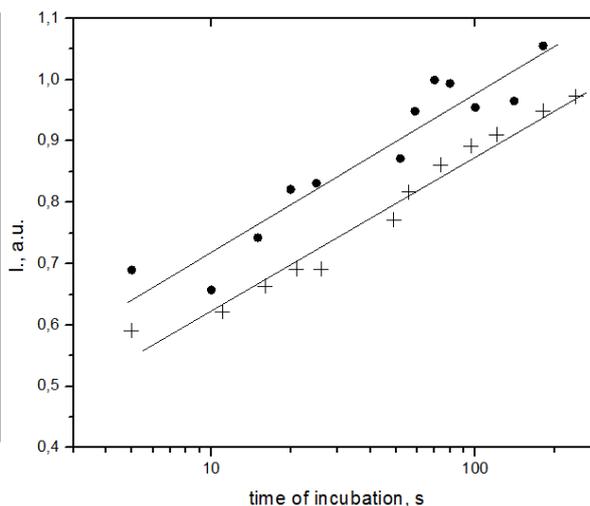


Рисунок 2 – Изменение интегральной интенсивности ЗФ (сплошные точки) и ФФ (крестики) эритрозина на участке 20 – 40 мкс кинетической кривой (поздняя кинетика) при инкубации образца молочной железы мыши в проточном газообразном азоте

Учитывая, что число триплетных возбуждений остаётся постоянным, а меняется только количество подвижного кислорода, тушение ранней кинетики ЗФ указывает на значительный вклад в свечение реакций СТА именно в данном временном диапазоне. Интенсивность реакции СТА в поздней кинетике ЗФ ограничивается, очевидно, низкой плотностью триплетных возбуждений. Сходная реакция интенсивности ЗФ на больших временах после возбуждения (когда вклад реакций СТА в свечение практически прекращается) и фосфоресценции (см. рис. 2) на снижении концентрации кислорода в тканях показывает, что триплетных возбуждения в таких условиях релаксируют независимо друг от друга. Моноэкспоненциальная форма затухания ЗФ и фосфоресценции в атмосфере азота указывает на малый вклад ЗФ, обусловленной взаимной аннигиляцией триплетных возбуждений. В свою очередь, это может свидетельствовать об ограниченной подвижности зондов, находящихся внутри биотканей. Таким образом, для тканей со значительно сниженным содержанием кислорода в полосе ЗФ доминирует ТЗФ, моноэкспоненциальная форма затухания которой соответствует кривой ФФ.

При удалении кислорода из среды дезактивация триплетных возбуждений происходит по альтернативным каналам, но с меньшей скоростью, что выражается в увеличении длительности послесвечения (см. рис. 1, кривая 2). Описанный эксперимент показывает хорошую чувствительность СТА-ЗФ к содержанию кислорода в среде, а также относительно высокую скорость реакций с участием кислорода.

Аналогичные изменения кинетических кривых затухания люминесценции зарегистрированы для тканей при фотодинамическом действии. Образующийся в тканях при лазерном воздействии СК может активно взаимодействовать со своим окружением и окислять компоненты клеток [2,3]. При этом локальное содержание кислорода в ткани будет уменьшаться, если по каким-то причинам затруднено кислородное снабжение тканей извне [16]. Так, для опухолей молочной железы мышей зарегистрировано обратимое тушение ранней кинетики ЗФ, аналогичное описанному выше (см. рис. 1, кривая 3). Тушение СТА-ЗФ наблюдалось при воздействии на окрашенную ткань серии лазерных импульсов, следовавших с периодом 0,1-0,2 секунды. Однако если период между возбуждениями превышал 1-2 секунды, для того же образца тушения ранней кинетики ЗФ не наблюдалось. Очевидно, это соответствует частичному или полному восполнению кислородных потерь за счёт диффузии.

Важно отметить, что для здоровых тканей молочной железы мышей подобное тушение наблюдается в несколько раз реже. Это может указывать на качественные отличия в характере генерации и поглощения СК в здоровых и опухолевых тканях.

Также можно обратить внимание на относительно слабый отклик кинетики фосфоресценции на изменение концентрации кислорода в тканях при фотодинамическом действии. На рисунке 3 изображен спектр замедленной люминесценции эозина в ткани опухоли мыши, полученный в начале и в конце экспозиции образцов несколькими

лазерными импульсами. Несмотря на то, что реакции СТА дают вклад только на незначительном участке в начале кинетической кривой, в полосе ЗФ после экспозиции наблюдается сильное тушение, тогда как для фосфоресценции не регистрируется настолько явных изменений.

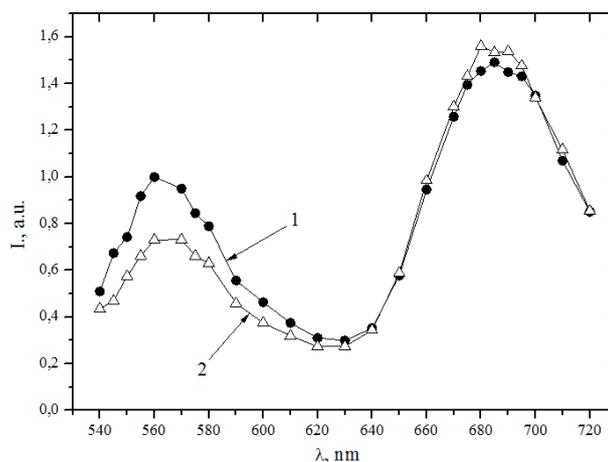


Рисунок 3 – Спектр замедленной люминесценции эозина в ткани опухоли мыши в начале (1) и в конце (2) экспозиции из серии лазерных импульсов

Мы полагаем, что это может происходить по двум причинам. Во-первых, в сравнении с опытами по дезоксигенации образцов при продувании азотом, в данном случае в тканях присутствует ещё достаточное количество кислорода, чтобы эффективно тушить фосфоресценцию и связанную с ней ТЗФ. Во-вторых, в тканях возможно существование недоступных для кислорода зондов, собственное свечение которых препятствует количественной оценке не реагирующих с кислородом триплетных возбуждений. Также не следует забывать, что реакции СТА конкурируют в том числе и с процессом фосфоресценции. Если ФС имеет пренебрежимо малую константу бимолекулярной реакции СТА, чувствительность его фосфоресценции к уровню кислорода в среде, возможно, будет выше.

Можно установить соответствие между интегральной интенсивностью СТА-ЗФ, измеряемую как площадь под кривой ранней кинетики ЗФ, и содержанием кислорода в ткани на момент возбуждения. Таким образом, интенсивность СТА-ЗФ представляет собой «мгновенный снимок» уровня кислорода в какой-то момент времени. Указанная особенность ЗФ может быть применена при мониторинге относительно быстрых изменений концентрации кислорода в ткани, например, в ходе сеанса фотодинамической терапии. На рисунке 4 показан пример, каким образом можно визуализировать восстановление равновесной концентрации кислорода в ткани после экспозиции из нескольких одинаковых лазерных импульсов. Набор точек 1 и 2 – интегральные интенсивности, соответствующие начальному и конечному содержанию кислорода (до и после экспозиции) в облучаемой ткани. Набор точек 3 получен при дополнительном (контрольном) возбуждении ткани в различные моменты времени после экспозиции, являясь в итоге неким набором «мгновенных снимков», показывающим постепенное восстановление равновесного физиологического уровня кислорода.

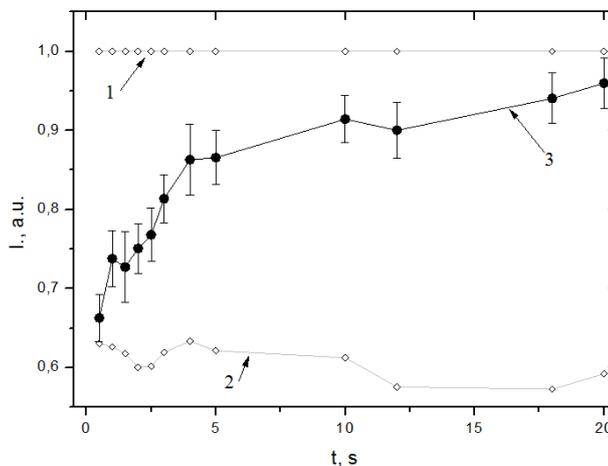


Рисунок 4 – Пример визуализации оксигенации ткани после фотодинамического действия. Показана интегральная интенсивность в начале (1) и в конце (2) экспозиции, а также интенсивность контролирующего возбуждения (3), подаваемого спустя различное время после экспозиции

Таким образом, СТА-3Ф может достаточно эффективно служить маркером уровня кислорода в ткани в сравнении с альтернативными методиками. Особую чувствительность СТА-3Ф проявляет к концентрации генерируемого СК в ткани во время лазерного облучения, причём, по-видимому, лучше других видов замедленной люминесценции ФС. Полученные результаты могут быть полезными в разработке методов мониторинга кислорода в биологических тканях.

Работа поддержана грантом 3.6358.2017/8.9 Министерства образования и науки Российской Федерации.

Список литературы / References:

1. Ormond A.B., Freeman H.S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 2013, vol. 6, pp. 817-840.
2. Hilderbrand S.A. Labels and Probes for Live Cell Imaging: Overview and Selection Guide Live Cell. *Imaging Methods in Molecular Biology*, 2010, vol. 591, pp. 17-45.
3. Nyokong T. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. Springer Science + Business Media B.V., 2012, ISBN: 978-90-481-3870-8 (Print), 978-90-481-3872-2 (Online).
4. Swartz H.M. Measuring real levels of oxygen *in vivo*: opportunities and challenges. *Biochem. Soc. Trans*, 2002, vol. 30, pp. 248-252.
5. Dmitriev R.I., Papkovsky D.B. Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cell. Mol. Life Sci*, 2012, vol. 69, pp. 2025-2039.
6. Baier J. [et al.] Time-Resolved Investigations of Singlet Oxygen Luminescence in Water, in Phosphatidylcholine, and in Aqueous Suspensions of Phosphatidylcholine or HT29 Cells. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, no. 7, pp. 3041-3046.
7. Skovsen E., Snyder J.W., Lambert J.D., Ogilby P.R. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J. Phys. Chem B*, 2005, vol. 109, no. 18, pp. 8570-8573.
8. Dëdic R., Svoboda A., Psencik J., Hala J. Phosphorescence of singlet oxygen and meso-tetra (4-sulfonatophenyl)porphin: time and spectral resolved study. *J. Mol. Struct*, 2003, vol. 651, pp. 301-304.
9. Piffaretti F. [et al.] Real-time, *in vivo* measurement of tissular pO₂ through the delayed fluorescence of endogenous protoporphyrin IX during photodynamic therapy. *J. Biomed. Opt.*, 2012, vol. 17, no. 11, pp. 115007.
10. Mik E.G. [et al.] *In vivo* mitochondrial oxygen tension measured by a delayed fluorescence lifetime technique. *Biophys. J*, 2008, vol. 95, pp. 3977-3990.
11. Wilson D.F. Oxygen dependent quenching of phosphorescence: a perspective. *Adv. Exp. Med. Biol*, 1992, vol. 317, pp. 195-201.
12. Lin H. Shen Y., Chen D., Lin L. Feasibility Study on Quantitative Measurements of Singlet Oxygen Generation Using Singlet Oxygen Sensor Green. *J. Fluoresc*, 2013, vol. 23, pp. 41-47.
13. Lee S. [et al.] Pulsed diode laser-based monitor for singlet molecular oxygen. *J. Biomed. Opt.*, 2008, vol. 13, no. 3, pp. 034010.
14. Scholz M., Biehl A., Dedic R., Hala J. Singlet-oxygen-sensitized delayed fluorescence in mammalian cells: a time-resolved microscopic approach. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 700-713.
15. Letuta S. N. Kuvandykova A.F., Pashkevich S.N., Saletskii A.M. Features of the delayed fluorescence kinetics of exogenous fluorophores in biological tissues. *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2013, vol. 87, pp. 1582-1587.
16. Letuta S.N. [et al.] Delayed luminescence of erythrosine in biological tissue and photodynamic therapy dosimetry. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, vol. 163, pp. 232-236.
17. Celli J.P. [et al.] Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem. Rev*, 2010, vol. 110, pp. 2795-2838.
18. Woodhams J.H., MacRobert A.J., Bown S.G. The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry. *Photochem. Photobiol. Sci*, 2007, vol. 6, pp. 1246-1256.
19. Moiseeva E.V. *Original Approaches to Test Anti-breast Cancer Drugs in a Novel Set of Mouse Models*. Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005, 191 p.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ МНОГОАТОМНЫХ ФЕНОЛОВ

Бовт Е.А., Кравченко Е.М., Дорошкевич В.С., Баранова О.В., Одарюк И.Д.

ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 83052

e-mail: bio-chem@mail.ru

Аннотация. Изучена кинетика хемилюминесценции в процессе ферментативного окисления многоатомных фенолов молекулярным кислородом в присутствии лакказы из *Trametes versicolor*. Установлен спектральный состав хемилюминесцентного свечения. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют в пользу протекания оксидазного процесса по радикальному механизму.

Ключевые слова: окисление, лакказы, хемилюминесценция, многоатомные фенолы, радикальный механизм.