

in Russia in 2013 (morbidity and mortality). Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute; Russian Ministry of Health, 2015, 250 p. (In Russ.)]

4. Зуйков С.А., Шатова О.П., Хомутов Е.В., Каплун Д.С. Исследование метаболизма пуриновых нуклеотидов, прооксидантной и антиоксидантной систем у больных раком желудка. *Евразийский Союз Ученых (ЕСУ)*, 2015, т. 8, № 17, ч. 3, с. 143-146. [Zuikov S.A., Shatova O.P., Khomutov E.V., Kaplyn D.S. Study of metabolism of purine nucleotides, prooxidant and antioxidant system in patients with gastric cancer. *Eurasian Scientific Union (ESU)*, 2015, vol. 8, no. 17, iss. 3, pp. 143-146. (In Russ.)]

5. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. Т. 1. 2-е изд., перераб. и доп., СПб.: Наука, 2008, 481 с. [Anisimov V. N. Molecular and Physiological Mechanisms of Aging, vol 2, 2nd ed. St. Petersburg: Publishing house Nauka, 2008, vol. 1, 481 p. (In Russ.)]

6. Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O., Van Veldhoven P.P. Aging, age-related diseases and peroxisomes. *Subcell. Biochem*, 2013, vol. 69, pp. 45-65.

7. Singh, K., Singh N., Chandy A., Manigauha A. In vivo antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Daucus carota* seeds in experimental animals. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2012, vol. 2, no. 6, pp. 385-388.

8. Totzeck M., Hendgen-Cotta U.B., Kelm M., Rassaf T. Crosstalk between Nitrite, Myoglobin and Reactive Oxygen Species to Regulate Vasodilation under Hypoxia. *PLoS ONE.*, 2014, vol. 9, no. 8, p. e105951.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АННИГИЛЯЦИОННОЙ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗОНДА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА В ОПУХОЛЯХ

Ишемгулов А.Т., Летута С.Н., Муханова А.Ф., Пашкевич С.Н., Сокабаева С.С.

Оренбургский государственный университет

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

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

Аннотация. В работе представлены результаты измерения кинетики длительной люминесценции эритрозина в опухолях и здоровых тканях молочной железы лабораторных мышей. Обнаружен эффект тушения замедленной флуоресценции в режиме строб-периодического возбуждения люминесценции, зависимый от частоты следования лазерных импульсов. Установлена связь описанного эффекта с уменьшением вклада в свечение реакций кросс-аннигиляции триплет-возбуждённого люминофора и синглетного кислорода. Проанализировано влияние тушения замедленной флуоресценции на интенсивность фосфоресценции зонда. Показано, что с помощью описанного явления можно оценить расходование тканевого кислорода в ходе фотодинамических процессов.

Ключевые слова: замедленная флуоресценция, биологические ткани, синглет-триплетная аннигиляция, синглетный кислород

ANNIHILATION DELAYED FLUORESCENCE OF PROBES AS A TUMOR OXYGEN LEVEL INDICATOR

Ishemgulov A.T., Letuta S.N., Mukhanova A.F., Pashkevich S.N., Sokabaeva S.S.

Orenburg State University

Pobedy av., 13, Orenburg, 460018, Russia

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

Abstract. The decay kinetics of erythrosine delayed luminescence in malignant and healthy biological tissues of laboratory mice was investigated. Upon periodical pulse excitation of luminescence an effect of delayed fluorescence suppression was discovered. The glow quenching value is dependent on the laser pulses repetition period. It is shown that the effect is associated with the decrease in the contribution of luminescence via photogenic annihilation reaction of triplet sensitizer and singlet oxygen excited states. In addition, the oxygen-dependent fluorescence decay affecting to the phosphorescence intensity is discussed. The obtained data suggest that it is possible to evaluate intensive oxygen consumption into a tissue using annihilation delayed fluorescence.

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

В основе фотодинамического эффекта лежит реакция переноса энергии с триплет-возбуждённой молекулы сенсibilизатора на кислород:



где T_1 – молекула сенсibilизатора в триплетном возбуждённом состоянии; S_0 , S_1 – в основном и первом возбуждённом синглетных состояниях, ${}^3\Sigma_g(O_2)$ – кислород в основном состоянии, ${}^1\Delta_g(O_2)$ – синглетный кислород (СК). Молекула кислорода при этом переходит в синглетное возбуждённое состояние и в определенных условиях может вступить в реакцию с непотушенными возбуждёнными состояниями люминофора, инициируя при этом синглет-триплет-аннигиляционную (СТА) замедленную флуоресценцию (ЗФ) [1, 2]:



Подобный механизм флуоресценции хорошо исследован для красителей в неживых системах наряду с другими видами ЗФ (например, E- или P-типов) [3, 4]. Однако наиболее перспективным выглядит изучение СТА в биологических системах, поскольку интенсивность ЗФ прямо пропорциональна количеству СК – важного участника многих биохимических реакций в клетке и основного активного компонента в фотодинамической терапии [1, 5-7]. В литературе можно обнаружить множество подходов, с помощью которых можно количественно охарактеризовать генерацию СК в рассматриваемой среде. Среди флуоресцентных выделяются две группы, предполагающие измерение свечения либо собственно СК [7, 8], либо сенсibilизатора [9, 10]. Методы, основанные на флуоресценции зонда, позволяют судить о динамике СК лишь опосредованно. Прямое детектирование фосфоресценции СК на 1270 нм в биологических системах затруднено из-за сильного тушения и низкой эффективности приёмников излучения в инфракрасной области. При использовании СТА объединяются преимущества обоих подходов: свечение, обусловленное реакцией с участием СК (2), можно наблюдать в видимом диапазоне [2, 11, 12]. Таким образом, представляется возможность мониторинга содержания кислорода в ткани и оценки эффективности фотодинамической терапии в реальном времени.

Показано, что основной вклад в ЗФ окрашенных эритрозином тканей на первых 10 мкс после импульсного возбуждения дает СТА [2, 12]. Содержание кислорода в тканях изменяется, поэтому изменяется соответствующая кинетика длительного послесвечения. В настоящей работе описано, как характеристики ЗФ зонда в ткани зависят от динамики накопления и расходования СК в ходе лазерного облучения.

Исследованы ткани мышей линии BYRB, у самок которых на определённых этапах жизненного цикла образуются специфические однотипные злокачественные опухоли молочных желёз [13]. Экспериментальные животные находились в обычных условиях содержания. Окрашивание производилось путём погружения биологического материала в водный раствор эритрозина исходной концентрации 10^{-3} моль/л. Промежуток времени между операцией на животном и завершённым экспериментом не превышал 1,5 часа.

Эритрозин используется в гистологии для окрашивания компонентов цитоплазмы клеток [14]. Его замедленная люминесценция представлена двумя выраженными полосами: флуоресценцией с максимумом на 570 нм и фосфоресценцией с максимумом 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 10-15 мВт и длительностью 15 нс, следующих с заданной частотой. После каждого импульса записывалась кинетика затухания люминесценции. Все измерения производились при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении.

Изменение кинетики ЗФ эритрозина в процессе фотодинамического действия было зарегистрировано при периодическом импульсном возбуждении окрашенной ткани опухоли с частотой 5 Гц. На рисунке 1 показано, что вид кинетических кривых с каждым следующим импульсом меняется: интегральная интенсивность на начальном участке кинетической кривой (0-10 мкс после лазерной вспышки) падает, а продолжительность ЗФ увеличивается. Аналогичная картина наблюдается при обескислороживании образцов при их выдержке в проточном азоте [2].

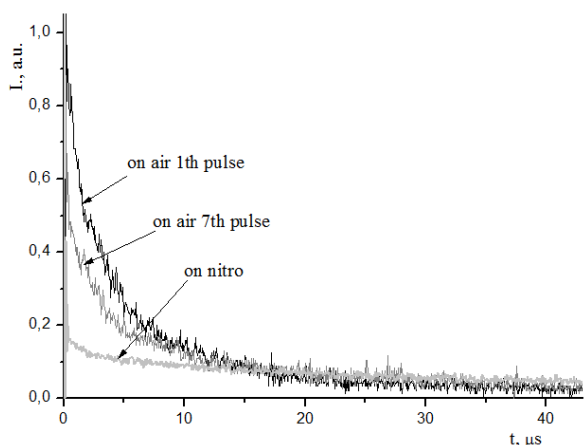


Рисунок 1 – Кинетика ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши после первого и седьмого возбуждающих импульсов. Для сравнения показана кинетика ЗФ эритрозина в той же ткани в атмосфере азота

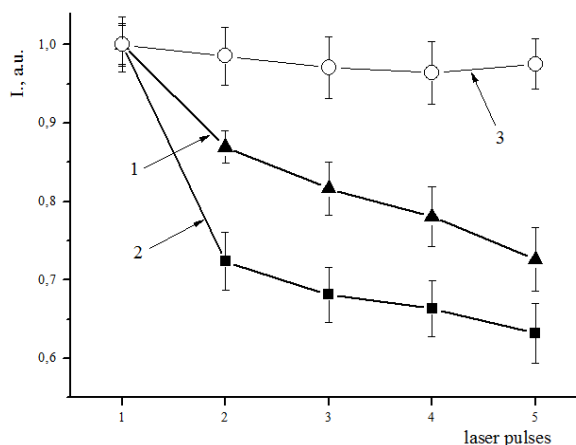


Рисунок 2 – Интегральные интенсивности для начального участка (1–10 мкс) кинетики ЗФ эритрозина при следовании возбуждающих импульсов с частотой 5 и 10 Гц (1 и 2) в опухоли и 10 Гц для здоровой ткани (3). Нормировано на интенсивность ЗФ после первого импульса

При увеличении периода следования импульсов возбуждения указанные различия постепенно нивелируются. Если интервал между импульсами превышает 2 сек, то эффект тушения ЗФ эритрозина не наблюдается. С ростом частоты возбуждения тушение, наоборот, усиливается (см. рис. 2). Важной особенностью данного процесса является то, что он наблюдается преимущественно в опухолевых тканях и практически не регистрируется в здоровых. Отсутствие заметного тушения ЗФ при аналогичных условиях возбуждения в здоровых тканях молочной железы мышей, вероятно, связано с избыточным накоплением сенсibilизатора в опухолях, что в совокупности с их гипоксией приводит к более интенсивной фотодинамике и расходу свободного кислорода [5, 6, 15].

Описанное явление не связано с фотохимическими изменениями молекул красителя. Об этом свидетельствуют отсутствие новых полос в спектрах люминесценции окрашенных образцов и ослабление эффекта тушения при увеличении периода возбуждения. Мы полагаем, что изменяется содержание кислорода в области фотореакции (2). СК обладает повышенной реакционной способностью, что проявляется как фотодинамический эффект – при генерации в опухоли СК активно окисляет компоненты клеток, вызывая их гибель [1, 5, 6]. При этом кислород переходит из свободного состояния в связанное в результате химического тушения:



где Q – некий тушитель. Дефицит диффузионно-подвижного кислорода, способного принимать участие в реакциях (1) и (2), возникнет, если за промежуток времени между актами возбуждения исходная концентрация кислорода в окрестности триплет-возбуждённых молекул люминофора за счёт диффузии полностью не восстановится. Этот процесс сопровождается тушением ЗФ. При уменьшении частоты следования лазерных импульсов концентрация кислорода в ткани успевает восстановиться и, согласно (2), интенсивность ЗФ не будет падать. Если возбуждать эритрозин в опухоли с периодом 0,2 с, то через 7 импульсов интенсивность ЗФ уменьшается примерно на 25 %. Для полного восстановления интенсивности потушенной флуоресценции в опухоли молочной железы требуется время $3,2 \pm 0,3$ с.

При тушении ЗФ интенсивность фосфоресценции незначительно растёт. Кинетика фосфоресценции эритрозина в опухоли показана на рисунке 3. Это можно объяснить тем, что при снижении вклада реакции (2) в свечение непотушенные триплетные состояния люминофора релаксируют по другим конкурирующим каналам, в том числе фосфоресценции, в результате чего её интенсивность возрастает. Спектры замедленной люминесценции при изменении концентрации кислорода в ткани показаны на рисунке 4.

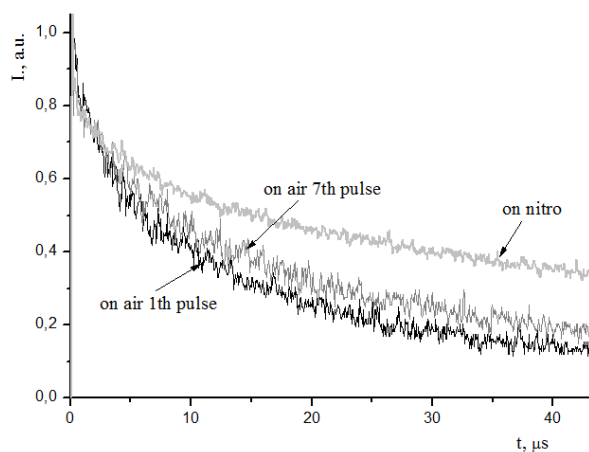


Рисунок 3 – Кинетика фосфоресценции эритрозина в опухоли молочной железы мыши после первого и седьмого возбуждающих импульсов в обычной атмосфере, и после пятиминутной инкубации образца в проточном газообразном азоте

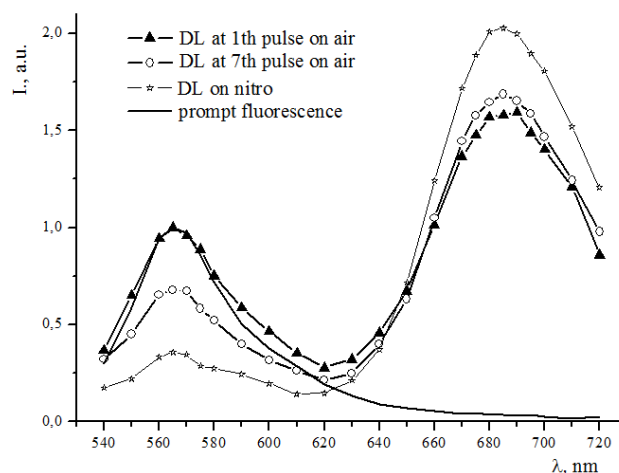


Рисунок 4 – Спектры замедленной люминесценции эритрозина в опухоли молочной железы мыши: на воздухе (после первого и седьмого возбуждающих импульсов), а также при инкубации в азоте (DL on nitro). Сплошная линия – спектр быстрой флуоресценции (prompt fluorescence)

Полученные данные свидетельствуют о значительном изменении содержания кислорода в биологических тканях при лазерном облучении. При высокочастотном или непрерывном возбуждении находящийся в непосредственном окружении сенсibilизатора кислород быстро расходуется на окисление субстрата (3), а его диффузия в область реакции происходит достаточно медленно; это негативно отражается на эффективности фотодинамической терапии.

Изменения интенсивности ЗФ и фосфоресценции закономерно объясняются уменьшением содержания подвижного кислорода в тканях. Из рисунка 4 видно, что амплитуда изменения интенсивности ЗФ при одной и той же разности концентрации кислорода в ткани превышает таковую для фосфоресценции. Высокая чувствительность ЗФ к концентрации кислорода в ткани связана с тем, что в генерации такого свечения СК

принимает непосредственное участие. Это делает ЗФ-механизм оптимальным методом для оценки содержания тканевого кислорода в сравнении с альтернативными (например, при анализе фосфоресценции [9, 10]). Поэтому использование ЗФ, обусловленной СТА, является перспективным в медицинской диагностике и фотодинамической терапии.

Список литературы:

1. Krasnovsky A. A. (Jr.) Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. History of Development and the Modern Status of Research. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, pp. 1065-1080.
2. Letuta S. N., Kuvandykova A. F., Pashkevich S. N., Saletskii A. M. Features of the delayed fluorescence kinetics of exogenous fluorophores in biological tissues. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2013, vol. 87, pp. 1582–1587.
3. Кучеренко М.Г. *Кинетика молекулярных фотопроцессов. Постановка и решение задач*. Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2012, 190 с. [Kucherenko M.G. *Kinetics of molecular photo processes. Problem formulation and solutions*. Orenburg: ООО ИПК «Университет», 2012, 190 p. (In Russ.)].
4. Berezin M.Y., Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.*, 2010, vol. 110, pp. 2641–2684.
5. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.*, 2009, vol. 24, pp. 259–268
6. Узденский А.Б. *Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии*. СПб.: Наука, 2010, 192 с. [Uzdensky A.B. *Cell and molecular mechanisms of photodynamic therapy*. Saint-Peterburg: Nauka, 2010, 129 p. (In Russ.)]
7. Snyder J.W., Skovsen E., Lambert J.D.C., Poulsen L., Ogilby P.R. Optical detection of singlet oxygen from single cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, vol. 8, pp. 4280-4293
8. Li B., Lin H., Chen D., Wilson B.C., Gu Y. Singlet oxygen detection during photosensitization. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 2013, vol. 6, pp. 1330-1332.
9. Papkovsky, D., Zhdanov, A.V., Fercher, A., Dmitriev, R., Hynes, J. Phosphorescent Oxygen-Sensitive Probes. *Springer Briefs in Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, pp. 1245-1255.
10. 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.
11. Scholz M., Dedic R., Valenta J., Breitenbach T., Hala J. Real-time luminescence microspectroscopy monitoring of singlet oxygen in individual cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, vol. 13, pp. 1203-1212.
12. Letuta S.N., Kuvandykova A.F., Pashkevich S.N. The Kinetics of Exogenous Phosphors Delayed Fluorescence in Tissues. *J. Anal. Oncology*, 2012, vol. 1, pp. 107-110.
13. Moiseeva E.V. *Original approaches to test antibreast cancer drugs in a novel set of mouse models*. Utrecht: Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005, 191 p.
14. Veuthey T., Herrera G., Doderio V.I. Dyes and Stains: from molecular structure to histological application. *Frontiers in Bioscience*, 2014, vol. 19, pp. 91-112.
15. Baker A., Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. *Photochem. Photobiol.*, 1992, vol. 55, p. 523.

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Каплун Д.С., Шатова О.П., Зинкович И.И.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

пр. Ильича, 16, г. Донецк, 83003, Украина

e-mail: kaplun.dascha@mail.ru

Аннотация. В эксперименте *in vitro* изучали влияние различных доз популярного противодиабетического препарата метформина (от 2 до 30 мМ) на осмотическую резистентность эритроцитов и содержание в них восстановленного глутатиона. Показано, что предварительная 60-минутная инкубация цельной крови здоровых доноров с метформином приводит к снижению резистентности эритроцитов к гипотоническим растворам. Обнаруженный эффект имеет линейный дозозависимый характер в интервале конечных концентраций метформина от 3 мМ до 10 мМ. Инкубация цельной крови с метформином приводит к существенному истощению в них пула восстановленного глутатиона, что может рассматриваться в качестве возможного механизма снижения их осмотической резистентности. Нельзя исключить и прямую модификацию метформином клеточных механизмов трансмембранного переноса ионов и воды в эритроцитах.

Ключевые слова: метформин, осмотическая резистентность эритроцитов, восстановленный глутатион.