

## КИНЕТИКА ДЛИТЕЛЬНОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ЗОНДОВ В КЛЕТКАХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

**Исследована кинетика замедленной флуоресценции молекул органических красителей в клетках молочной железы здоровых самок мышей линии BYRB и особей со спонтанными злокачественными опухолями. Обсуждаются механизмы тушения длительной люминесценции молекул в клетках биотканей. Экспериментально показано, что экзогенные флуорофоры более доступны для кислорода в клетках, выделенных из нормальных тканей.**

**Ключевые слова:** лазерная диагностика, молекулярные зонды, длительная люминесценция.

Общие закономерности кинетики длительной люминесценции органических молекул в газовой фазе, гомогенных твердых и жидких растворах хорошо изучены [1-4]. В системах же, характеризующихся специфической организацией, например в клетках биологических тканей, кинетика фотопроцессов недостаточно исследована. Эффективность фотопревращений, происходящих в молекулярных зондах внутри клеток, определяется составом внутриклеточных структур, характером их взаимодействия с зондами, строением клеточных мембран и служит источником информации о состоянии биотканей. В этой связи изучение кинетики замедленной флуоресценции (ЗФ) органических молекул в клетках биотканей представляет практический интерес не только для биофизики и молекулярной биологии, но и для медицины.

В настоящей работе методом импульсного лазерного фотолиза исследована эффективность конкурирующих между собой излучательных и безизлучательных каналов релаксации возбужденных состояний молекул красителей в клетках молочной железы здоровых самок мышей линии BYRB и особей со спонтанными злокачественными опухолями той же линии [5].

Для получения клеток фрагменты опухолевой и нормальной ткани молочной железы подвергались ферментативной диссоциации в растворе коллагеназы концентрации 0,5 мг/мл в фосфатном буфере (рН = 7,4) при температуре 37 °С. Полученные суспензии клеток наносились на питательную среду. В качестве питательной среды использовался биополимер «Гиаматрикс», представляющий собой полимерную пластину, изготовленную путем фотохимической сшивки макромолекул в гидрогеле на основе гиалуроновой кислоты с добавлением кол-

лагена [6]. Толщина пластины составляла 0,25 мм, плотность материала – 340 кг/м<sup>3</sup>. Биоматериал с клетками помещали в чашку Петри и инкубировали при стандартных условиях. Использование такой питательной среды обеспечивало требуемую жизнеспособность клеток в течение эксперимента.

В качестве молекулярных зондов (экзогенных флуорофоров) были выбраны ксантеновые красители – эозин, эритрозин и бенгальский розовый. Выбор данного класса красителей обусловлен их физико-химическими свойствами: высоким квантовым выходом в триплетное состояние [7], интенсивной ЗФ и фосфоресценцией, хорошей растворимостью в воде, способностью проникать внутрь клеток [8]. Для окрашивания полимеров с культивируемыми клетками их помещали в водный раствор красителя с концентрацией 10<sup>-4</sup> М и выдерживали в течение 10 мин.

Экспериментально измерялась кинетика затухания ЗФ ( $\lambda_{\text{max}} = 560$  нм) молекул красителей после импульсного фотовозбуждения. Для возбуждения молекул использовалось излучение второй гармоники лазера на YAG:Nd с длиной волны  $\lambda = 532$  нм, работающего в импульсно-периодическом режиме. Возбуждающее излучение поглощалось только молекулами флуорофоров, но не поглощалось питательной средой. Параметры возбуждающего импульса: длительность импульса – 10 нс, энергия – до 20 мДж.

Кинетика затухания длительной люминесценции регистрировалась через монохроматор МДР-41 с помощью ФЭУ-84, чувствительность которого в момент возбуждения понижалась на несколько порядков («запирание» ФЭУ) путем подачи на управляющий электрод импульса отрицательной полярности. Синхронизация запуска лазера, регистрирующей системы и за-

пириания ФЭУ, а также сбор, накопление и первичная обработка экспериментальных данных осуществлялись на автоматизированной установке, включающей ПК и крейт-КАМАК, с длительностью фронта переходной характеристики 200 нс.

Окрашенные фрагменты питательной среды с клетками помещались в специально изготовленную вакуумируемую термостатируемую камеру. Такая камера необходима для исследования тушения триплетных состояний флуорофоров кислородом.

На рис. 1 представлена фотография поперечного среза питательной среды с культивируемыми на ней клетками. Видно, что клетки располагаются в тонком приповерхностном слое среды. В ходе приготовления образцов неизбежно окрашивались как клетки, так и сама питательная среда. Экспериментально регистрировались сигналы свечения красителей с некоторой площади поверхности исследуемого образца, освещаемой лазерным пучком, т. е. вклад в общий сигнал давали как молекулы, находящиеся в клетках, так и молекулы в полимере. Поэтому отдельно исследовался характер длительной люминесценции флуорофоров в питательной среде. Для этого в качестве образцов сравнения использовались окрашенные полимерные пленки без клеток.

Исследуемая нами длительная люминесценция есть результат излучательной релаксации метастабильных триплетных состояний молекул. Такие состояния образуются в результате внутримолекулярной интеркомбинационной конверсии с первого возбужденного синглетного уровня молекул [9]. Время жизни триплетных состояний органических молекул примерно на пять порядков величины превышает длительность возбуждающего импульса. В дальнейшем будем рассматривать процессы, происходящие с ансамблем молекул красителей в триплетном состоянии, сформированным по окончании возбуждающего лазерного импульса.

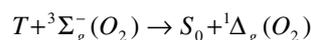
В питательной среде и в клетках биотканей содержатся различные тушители триплетных состояний, с которыми молекулы красителей могут эффективно взаимодействовать. Поэтому теоретическое исследование кинетики длительной люминесценции сводится к задаче о возбуждении доноров энергии (молекул красителей), находящихся в конденсированной

среде акцепторов в условиях ненасыщающего возбуждения. При низкоинтенсивном возбуждении заселенность первого синглетного уровня донора пропорциональна интенсивности возбуждения.

Донор возбуждается в полосе синглет-синглетного поглощения и переходит в триплетное состояние. После этого возможен термостимулированный возврат в синглетное  $S_1$ -состояние с излучением кванта ЗФ или прямой излучательный переход  $T_1 \rightarrow S_0$  в основное состояние – фосфоресценция. Существует вероятность триплет-триплетной аннигиляции мигрирующих или неподвижных молекул донора с последующим образованием их основного и возбужденного синглетных состояний. Образовавшиеся синглет-возбужденные состояния дают свой вклад в кинетику ЗФ.

В результате обменного взаимодействия энергия возбуждения может передаваться на акцептор, а донор безызлучательно возвращается в основное состояние. В акцепторе происходит быстрая релаксация возбуждения, уменьшающая вероятность возврата энергии к донору. Концентрацию доноров будем считать достаточно малой, и переносом энергии по ним пренебрежем. Кроме того, не будем учитывать фотодegradацию доноров в процессе возбуждения, т. е. исходная концентрация молекул красителей в системе остается неизменной.

Эффективным тушителем триплетных состояний доноров является молекулярный кислород. При этом в ходе сенсibilизированного заселения в реакции



образуется синглетный  ${}^1\Delta_g(O_2)$  кислород. Здесь  $S_0$  и  $T_1$  – основное синглетное и триплетное со-

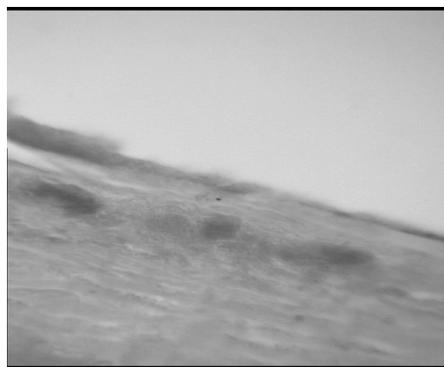
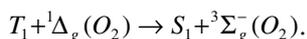


Рисунок 1. Поперечный срез питательной среды с культивируемыми на ней клетками

стояния молекулы красителя соответственно,  ${}^3\Sigma_g^-(O_2)$  – основное триплетное состояние молекулы кислорода.

В [10-12] показано, что возможна аннигиляция оставшихся (непотушенных) триплетных возбуждений красителя с мигрирующим  ${}^1\Delta_g(O_2)$  кислородом, в результате которой образуются синглетные  $S_1$  состояния донора, дающие дополнительный вклад в ЗФ:



Таким образом, в присутствии кислорода регистрируемая кинетика ЗФ представляет собой еще и суперпозицию двух различных по своей природе сигналов, каждый из которых содержит информацию о состоянии среды.

Скорость релаксации по колебательным подуровням синглетных и триплетных состояний существенно превосходит скорости передачи возбуждения с термализованных уровней данного электронного состояния, иначе говоря, время жизни основных колебательных подуровней возбужденных электронных состояний много больше времен жизни других подуровней сложных молекул. Наконец, сильное адиабатическое уширение уровней многоатомных молекул в масштабе рассматриваемых времен обеспечивает практически мгновенную релаксацию поляризации донора и акцептора.

Все вышесказанное позволяет использовать балансные уравнения для заселенностей электронных состояний. Исходя из баланса описанных процессов, выпишем систему кинетических уравнений:

$$\frac{dN_T}{dt} = -(k_1 + k_2 + k_4 N_{O_2} + k_5 N_{\Delta} + k_6 N_A) N_T - 2k_3 N_T^2$$

$$\frac{dN_{O_2}}{dt} = -k_4 N_T N_{O_2} + (k_5 N_T + k_7) N_{\Delta}$$

$$\frac{dN_{\Delta}}{dt} = k_4 N_T N_{O_2} - (k_5 N_T + k_7) N_{\Delta}$$

$$\frac{dN_0}{dt} = (k_2 + k_6 N_A + k_4 N_{O_2}) N_T + k_3 N_T^2 + k_8 N_1 \quad (1)$$

$$\frac{dN_1}{dt} = (k_1 + k_5 N_{\Delta}) N_T + k_3 N_T^2 - k_8 N_1$$

где  $k_1$  – константа скорости обратной  $T_1 \rightarrow S_1$  интеркомбинационной конверсии,  $\tau_2 = 1/k_2$  – время жизни фосфоресценции,  $k_3$  – константа скорости триплет-триплетной аннигиляции молекул красителя,  $k_4$  – константа скорости тушения триплетных состояний донора молеку-

лярным кислородом,  $k_5$  – константа скорости триплет-синглетной аннигиляции,  $k_6$  – константа скорости обмена возбуждением доноров с акцепторами,  $\tau_{\Delta} = 1/k_7$  – время жизни синглетного кислорода,  $k_8$  – суммарная скорость излучательной и безызлучательной релаксации  $S_1$  – состояния донора. В системе (1)  $k_1, k_2, k_7$  и  $k_8$  – константы скоростей первого порядка ( $c^{-1}$ ),  $k_3, k_4, k_5$  и  $k_6$  – константы скоростей второго порядка ( $cm^3 \cdot c^{-1}$ ).

При написании уравнений (1) не учтен обратный перенос энергии с акцептора на донор. До термализации по колебательным подуровням  $\omega_D = \omega_A$ , где  $\omega_D$  – плотность вероятности переноса возбуждения с донора на акцептор,  $\omega_A$  – плотность вероятности обратного процесса. В другом предельном случае:  $\omega_A = \exp(-\Delta E/kT)\omega_D$  – сначала происходит термализация по колебательным подуровням донора и возбужденных состояний акцептора и для возврата энергии донору требуется тепловая активация. Мы полагаем, что в акцепторе происходит быстрая релаксация и вероятность возврата энергии донору мала.

Система уравнений (1) решалась численно. В рассматриваемом масштабе времен в последнем уравнении системы (1) использовано квазистатическое приближение  $\frac{dN_1}{dt} = 0$ . В начальный момент времени концентрация синглетного кислорода  $N_{\Delta}(0)$  принималась равной нулю, населенности первого триплетного и основного уровней составляли соответственно  $N_T(0) = 0.85N$  и  $N_0(0) = 0.15N$ , где  $N$  – исходная концентрация красителя.

На рис. 2 приведены экспериментальные кривые ЗФ эритрозина в питательной среде без клеток (3) и в клетках, выделенных из нормальных тканей (1) и злокачественных опухолей (2) молочной железы самок мышей линии BYRB, при атмосферном давлении над поверхностью исследуемых образцов. Видно, что в биополимере молекулы красителей недоступны для кислорода и основным процессом, определяющим характер кинетики ЗФ, является безызлучательный перенос энергии на акцепторы. Это подтверждается экспериментально. При увеличении давления воздуха (концентрации кислорода) над поверхностью биополимера от 1 мм рт. ст. до атмосферного кинетика затухания ЗФ практически не изменяется. В результате переноса

энергии на окружение время жизни ЗФ красителя сокращается до 15 мкс.

В клетках характер кинетики ЗФ существенно иной. При повышении давления воздуха в камере с окрашенными клетками до атмосферного происходит трансформация кинетики ЗФ красителей (рис. 2). С ростом концентрации кислорода аннигиляционная составляющая увеличивается, происходит так называемое «разгорание ЗФ», кинетическая кривая приобретает характерный горбообразный вид, а интенсивность и длительность термоактивационной ЗФ уменьшаются. При этом в клетках, выделенных из нормальных и патогенных тканей, эти процессы идут по-разному. В условиях наших экспериментов экзогенные флуорофоры оказались более доступными для кислорода в клетках, выделенных из нормальных тканей. Мы полагаем, что эти различия могут найти практическое применение при разработке альтернативных методов флуоресцентной диагностики патологии биотканей.

На рис. 3 показаны экспериментальные (сплошные линии) и расчетные (точки) кривые как результат решения системы дифференциальных уравнений (1) кинетики ЗФ красителей в опухолевых и нормальных клетках.

При нормальных условиях в цитоплазме клеток доминирующим процессом, определяющим характер ЗФ эндогенных флуорофоров, является тушение их триплетных состояний молекулярным кислородом с последующей  $T_1 \rightarrow {}^1\Delta_g(O_2)$  аннигиляцией. Изменение  $\omega_D$  вплоть до двух порядков величины приводит лишь к незначительному изменению кинетики ЗФ на «хвосте» кривой.

Принимая это во внимание и полагая, что миграция молекул кислорода в клетках достаточно эффективна, для описания наблюдаемых процессов целесообразно использовать формально-кинетический подход. Интенсивность суммарной ЗФ молекул в рассматриваемом приближении определяется выражением [11, 12]

$$I_{3\Phi}(t) = \varphi_{\Phi_1} k_5 p_S N_T(t) N_{\Delta}(t) + \varphi_{\Phi_2} k_1 N_T(t). \quad (2)$$

Первое слагаемое в (2) определяет аннигиляционную составляющую люминесценции, а второе – термоактивационную. Через  $\varphi_{\Phi_1}$  обозначен квантовый выход флуоресценции,  $p_S$  – вероятность образования  $S_1$  состояний молекул в реакции  $T \rightarrow {}^1\Delta_g$  аннигиляции. Кинетика

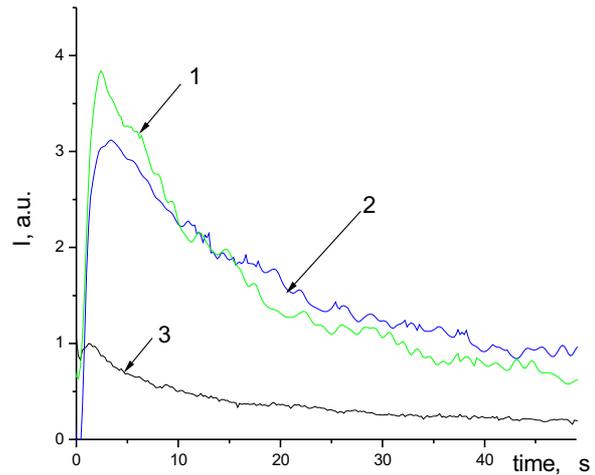


Рисунок 2. Кинетика ЗФ эритрозина в клетках, выделенных из нормальных тканей (1), патогенных тканей (2) и в питательной среде (3)

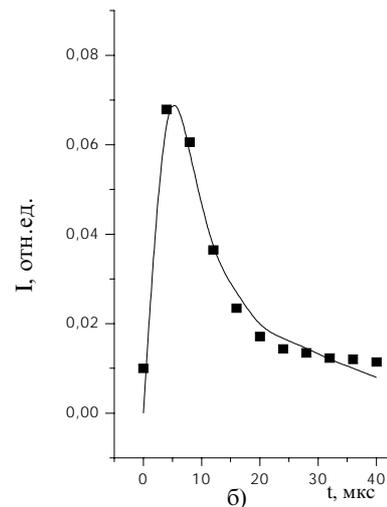
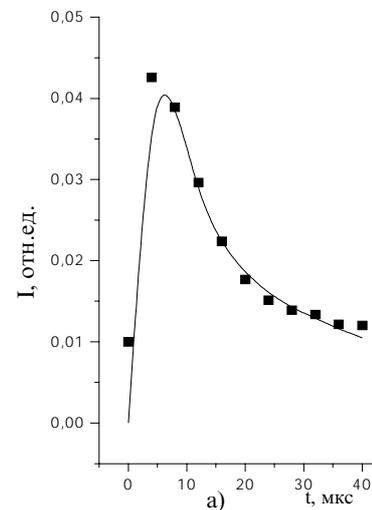


Рисунок 3. Экспериментальные (сплошные линии) и теоретические (точки) кривые кинетики ЗФ красителей в опухолевых (а) и нормальных клетках (б)

$I_{3\phi}(t)$  на коротких временах обусловлена главным образом множителем  $N_{\Delta}(t)$  в аннигиляционной составляющей, поскольку вклад второго слагаемого в (2) невелик.

Как видно из рис. 3, концентрация молекулярного кислорода в опухолевых клетках мень-

ше, чем в нормальных клетках. Это согласуется с данными работы [13], в которой установлено увеличение скорости потребления кислорода в опухолевых клетках, а также с результатами [14], где высказано предположение о гипоксии патогенных тканей.

26.11.2010 г.

**Список использованной литературы:**

1. Ermilov E.A., Markovskii O.L., Gulis I.M. Inductive-resonant triplet-triplet annihilation in solid solutions of erythrosine // Journal of applied spectroscopy. – 1997. – V. 64. – №5. – P. 642–645.
2. Duchowicz R., Ferrer M.L., Ulises Acuiat A. Kinetic spectroscopy of erythrosine phosphorescence and delayed fluorescence in aqueous solution at room temperature. // Photochemistry and Photobiology. – 1998. – V. 68. – №4. – P. 494–501.
3. Bryukhanov V.V., Ketsle G.A., Laurinas V.Ch., Levshin L.V., Muldakhmetov Z.M. Singlet-triplet annihilation of singlet oxygen and triplet xanthen dye molecules in liquid solution // Zhurnal prikladnoi spektroskopii. – 1987. – V. 46. – №4. – P. 588–593.
4. Мельников А.Г., Салецкий А.М., Кочубей В.И., Правдин А.Б., Курчатov И.С., Мельников Г.В. Триплет-триплетный перенос энергии между люминесцентными зондами, связанными с альбуминами // Оптика и спектроскопия. – 2010. – Т. 109. – №2. – С. 216–221.
5. Moiseeva E.V. Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models. Proefschrift, 2005.
6. Летуа С.Н., Маряхина В.С., Рахматуллин Р.Р., Забиров Р.А. Способ получения жизнеспособных клеток молочной железы. Решение о выдаче патента №2009 116 530 от 10.08.2010.
7. Rohatgi-Mukherjee K.K., Mukhopadhyay A.K. Photophysical processes in halofluorescein dyes // Indian J. of Pure and Applied Phys. – 1976. – V. 14. – P. 481.
8. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 277 с.
9. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей. М.: Наука, 1967.
10. Kenner R.D., Khan A.U. Molecular oxygen enhanced fluorescence of organic molecules in polymer matrices: a singlet oxygen feedback mechanism // J. Chem. Phys. – 1976. – V. 64. – P. 1877.
11. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летуа С.Н. Селективное лазерное усиление флуктуаций скорости реакций  $A+B \rightarrow 0$  // Известия АН СССР. Сер. физ. – 1993. – Т. 57. – С. 175.
12. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летуа С.Н. Изменение кинетики аннигиляционной люминесценции красителей в полимерах под действием лазерного импульса // Опт. и спектр. – 1995. – Т. 78. – С. 649.
13. Эммануэль Н.М., Кавецкий Р.Е., Тарусов Б.Н., Сидорик Е.П. Биофизика рака. Киев: Наукова думка, 1976. – 287 с.
14. Горенков Р.В., Карпов В.Н., Рогаткин Д.А., Шумский В.И. Хроническая гипоксия как один из факторов повышенной флуоресценции эндогенных порфиринов в живых биологических тканях // Биофизика. – 2007. – Т. 52. – С. 711.

**Работа выполнена при поддержке ФЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)» №1.1.06, РФФИ, проект №09-02-99020, и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, договор №14 от 01.02.2010 г.**

Сведения об авторах: **Летуа Сергей Николаевич**, профессор кафедры биохимической физики, проректор по научной работе Оренбургского государственного университета, доктор физико-математических наук, профессор

**Пашкевич Сергей Николаевич**, доцент кафедры биохимической физики Оренбургского государственного университета, кандидат физико-математических наук, доцент

**UDC 535.37**

**Letuta S.N., Maryakhina V.S., Pashkevich S.N., Rakhmatullin R.R.**

**KINETICS OF DELAYED LUMINESCENCE OF MOLECULAR PROBES IN CELLS OF BIOLOGICAL TISSUE**

This report addresses the kinetics of delayed fluorescence of organic dye molecules in the cells of the breast of healthy female mice pertaining to BYRB line and individuals with spontaneous malignant tumors. It discusses the mechanisms of suppression of delayed luminescence of molecules in the cells of tissues. It was experimentally shown that exogenous fluorophores are more accessible to oxygen in cells isolated from normal tissues.

Keywords: laser diagnostics, molecular probes, a long luminescence.