

ЛАЗЕРНОЕ ИНИЦИИРОВАНИЕ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЭКЗОГЕННЫХ ФЛУОРОФОРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

Представлены результаты исследований особенностей кинетики замедленной флуоресценции (ЗФ) и фосфоресценции экзогенных флуорофоров (молекул органических красителей) в биологических тканях. Обсуждаются возможные причины различий кинетики ЗФ в здоровых и патогенных тканях *in vitro*.

Ключевые слова: флуоресценция, фосфоресценция, исследование биологических тканей.

Введение

Оптические методы исследования биологических тканей позволяют, не травмируя объект изучения, получить о нем информацию, достаточную для диагностики его состояния. Среди распространенных методов диагностики выделяют лазерную флуоресцентную диагностику [1-4], основанную на сравнительном анализе спектрально-люминесцентных свойств эндогенных или экзогенных флуорофоров в нормальных и патогенных биологических тканях. Известны также методики, основанные на измерении кинетических характеристик короткоживущих (1 – 10 нс) синглетных состояний флуорофоров [5 – 8].

Из доступных литературных источников нам не удалось получить сведений об использовании кинетических параметров долгоживущих ($10^3 - 10^5$ нс) триплетных состояний зондов для диагностики биотканей, хотя потенциально такие параметры могут оказаться более чувствительными к состоянию окружения. Возможно, это связано с недостатком информации о специфике и различиях релаксации триплетных состояний флуорофоров в различных биосистемах. В настоящей работе представлены результаты изучения кинетики ЗФ и фосфоресценции экзогенных флуорофоров в патогенных и нормальных тканях мышей. На основе анализа эффективности конкурирующих каналов релаксации триплетных состояний зондов выявлены характерные особенности и отличия длительного послесвечения в здоровых и пораженных тканях.

Методы и объекты исследования

Исследованы ткани молочной железы здоровых самок и особей со спонтанными злокачественными опухолями мышей линии BYRB [9].

Экспериментально измерялась ЗФ ($\lambda_{max} = 570$ нм) и фосфоресценция ($\lambda_{max} = 680$ нм) тканей, окрашенных водным раствором эритрозина (Эр), после их облучения лазерным импульсом длительностью 10 нс ($\lambda = 532$ нм). Кинетика длительной люминесценции регистрировалась с помощью фотумножителя с управляющим электродом для «запирания» ФЭУ на время вспышки лазера.

Образцы помещали в герметичную термостатируемую камеру. Газовый состав атмосферы в камере регулировался дозированной продувкой газообразным азотом с чистотой 99.5%.

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 показана характерная кинетика ЗФ Эр в опухоли молочной железы мыши при различном газовом составе атмосферы в камере с образцом.

Наибольшая интенсивность сигнала (кривая 1, рис.1) зарегистрирована при естественном воздухе в камере с образцом через 2 мкс после «отпирания» ФЭУ. По мере увеличения времени продувки камеры азотом и, следовательно,

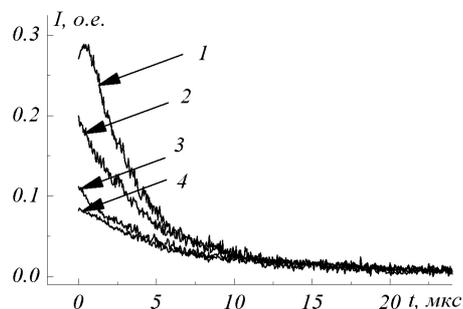


Рисунок 1. Кинетика ЗФ эритрозина в опухоли молочной железы мыши при различном газовом составе атмосферы в камере с образцом: 1 – естественный воздух; 2...4 – после продувки камеры азотом в течение 1, 5 и 10 сек соответственно

уменьшения концентрации кислорода, участок нарастания сигнала на кривой исчезает, амплитуда сигнала падает и кинетика становится монотонно затухающей (кривые 2 – 4, рис. 1).

Кривая 3Φ складывается из трех составляющих, имеющих различную природу [13-15] и может быть описана уравнением вида:

$$I_{3\Phi}(t) = A_1 N_T(t) N_{\Delta}(t) + A_2 N_T^2(t) + A_3 N_T(t), \quad (1)$$

где A_1, A_2 и A_3 – неотрицательные константы, $N_T(t)$ – концентрация триплет-возбужденных молекул красителя, $N_{\Delta}(t)$ – концентрация синглетного кислорода. Первое слагаемое в этом уравнении определяет составляющую люминесценции, обусловленную синглет-триплетной $T_1 + {}^1\Delta_g(O_2)$ аннигиляцией (СТА), второе – триплет-триплетной $T_1 - T_1$ аннигиляцией (ТТА), а третье – термостимулированной 3Φ (ТЗФ).

Немонотонная зависимость интенсивности 3Φ от времени на коротких временах обусловлена накоплением синглетного кислорода в процессе взаимодействия триплет-возбужденных молекул красителя с молекулярным кислородом в основном (триплетном) состоянии и последующей СТА (кривая 1 на рис. 1). С уменьшением содержания кислорода в среде, при неизменной концентрации красителя, эффект немонотонного нарастания 3Φ за счет СТА не проявляется на фоне быстро спадающих во времени ТТА и ТЗФ (1). Этот режим затухания 3Φ отражен в кривых 2, 3 и 4 на рисунке 1.

Для определения вклада аннигиляционных процессов в регистрируемый сигнал исследована кинетика 3Φ красителей в двух крайних случаях: при нормальной атмосфере в камере и после ее длительной продувки азотом. Полученные экспериментальные кривые 3Φ для нормальной ткани и опухоли при малой и большой концентрации кислорода в среде показаны на рисунке 2 (кривые с номером 1 на вставках **A, B, D и E**, рис. 2).

Как в здоровой ткани, так и в опухоли при нормальной атмосфере над образцами и, следовательно, значительной концентрации молекулярного кислорода в клетках, кинетика 3Φ содержит на коротких временах участок нарастания, которого нет при малых концентрациях кислорода. При этом в здоровых и патогенных тканях кинетика 3Φ существенно различается.

При анализе этих кривых учитывалось, что функция времени $N_T(t)$ в выражении (1) пропорциональна мгновенному значению интенсивности фосфоресценции образца $I_{\text{фос}}(t)$, т.е.

$$I_{3\Phi}(t) = B_1 I_{\text{фос}}(t) N_{\Delta}(t) + B_2 I_{\text{фос}}^2(t) + B_3 I_{\text{фос}}(t), \quad (2)$$

где B_1, B_2 и B_3 – неотрицательные постоянные коэффициенты.

Технически с помощью вычислительных средств подбирались такие значения коэффициентов $B_2 - B_3$ и такие параметры пробных функций $B_1 * N_{\Delta}(t)$, при которых правая часть (2) наилучшим образом аппроксимирует экспериментальную кривую $I_{3\Phi}(t)$ по методу наименьших квадратов.

Для случая малой концентрации кислорода в клетках в качестве пробной функции $N_{\Delta}(t)$ взята затухающая экспонента, поскольку уже к моменту окончания лазерной вспышки практически весь триплетный кислород переведен в синглетное состояние и в дальнейшем величина $N_{\Delta}(t)$ только убывает. При большой концентрации кислорода в клетках функция $N_{\Delta}(t)$ представляла собой сумму трех или четырех лоренцевых кривых.

Результаты аппроксимации экспериментальных кривых при малой и большой концентрации кислорода в здоровой ткани и опухоли показаны на рисунке 2 (кружки на вставках **A, B, D и E** рис. 2, соответственно). Коэффициенты B_2 и B_3 сведены в таблицу 1. Там же приведены относительные вклады (оцененные по площади под соответствующей кривой) в сигнал 3Φ от процессов СТА, ТТА и ТЗФ.

Из рисунка видно, что выбор вида функции $N_{\Delta}(t)$ для каждого случая оправдан, поскольку достигнута удовлетворительная аппроксимация экспериментальных кривых 3Φ при разной концентрации кислорода в нормальных и патогенных тканях.

Таблица 1. Подгоночные коэффициенты в уравнении (2) и относительные интегральные вклады различных типов длительного послесвечения в общий сигнал

Параметр	Патология	Норма
B_2	0,39	0,24
B_3	1,11	1,37
	3,48	1,93
Интегр. вклад СТА	0,04	0,04
Интегр. вклад ТТА	0,25	0,41
Интегр. вклад ТЗФ	0,71	0,55

Анализ данных таблицы 1 свидетельствует о том, что в атмосфере азота относительный вклад TTA в 3Φ заметно больше в нормальной ткани. Причиной тому может быть меньшая вязкость цитоплазмы клеток нормальной ткани, в которой молекулы флуорофора более подвижны и вероятность их взаимодействия выше. Различия в вязкости цитоплазмы клеток здоровых тканей и опухолей установлены ранее в работах [17-21]. Полученные нами результаты подтверждают эти выводы и дают косвенный метод оценки вязкости цитоплазмы клеток.

Интенсивность и длительность свечения, обусловленного $СТА$, в здоровой и патогенной тканях отличаются, но относительный интегральный вклад этого процесса в кинетику 3Φ в разных тканях при малой концентрации кислорода одинаков. Равенство вкладов можно объяснить тем, что синглетный кислород в здоровых тканях расходуется быстрее за счет большей подвижности молекул в менее вязкой цитоплазме. Это предположение подтверждается кинетикой безразмерных функций $B_1 * N_{\Delta}(t)$ (вставка C на рис. 2), отражающих изменение концентрации синглетного кислорода.

Сравнение данных табл. 1 и вида кривых 3Φ в атмосфере азота и при естественном воздухе в камере показывает, что изменение относительных вкладов трех составляющих 3Φ соответствует ожидаемому возрастанию роли $СТА$ при увеличении концентрации кислорода. Вместе с тем это возрастание необычно велико и приводит к полному исчезновению вклада TTA в регистрируемый сигнал.

Обращает на себя внимание существенная разница в ходе безразмерных функций $B_1 * N_{\Delta}(t)$ при большой концентрации кислорода в камере (вставка F на рис. 2). Мгновенные значения $B_1 * N_{\Delta}(t)$ через коэффициент B , зависят от условий образования столкновительных пар флуорофор – кислород, т.е. потенциально могут быть индикаторами спе-

цифического состояния клеток. С другой стороны, $B_1 * N_{\Delta}(t)$ через $N_{\Delta}(t)$ увеличивается с ростом концентрации кислорода в клетках. Однако представляется маловероятным, что столь значительное отличие кривых $B_1 * N_{\Delta}(t)$ в нормальной ткани и опухоли объясняется разной исходной концентрацией кислорода в клетках.

Известно [22-25], что в клетках тканей человека и животных имеют место механизмы, поддерживающие сравнительно «безопасную» концентрацию кислорода и его активных форм ($AФК$) в цитоплазме. К ним относят защитные меры надклеточного уровня, снижающие снабжение клеток кислородом, а также внутриклеточные процессы – четырехэлектронное восстановление внутриклеточного кислорода при участии цитохромоксидазы без освобождения свободных радикалов; ферментативное удаление образовавшегося супероксидного анион-радикала и перекиси водорода, антоксидантную нейтрализацию $AФК$ и др. Однако в наших экспериментах все эти механизмы либо выключены (нет кровоснабжения), либо недостаточно эффективны по сравнению с мощным диффузионным потоком кислорода прямо из атмосферы через мем-

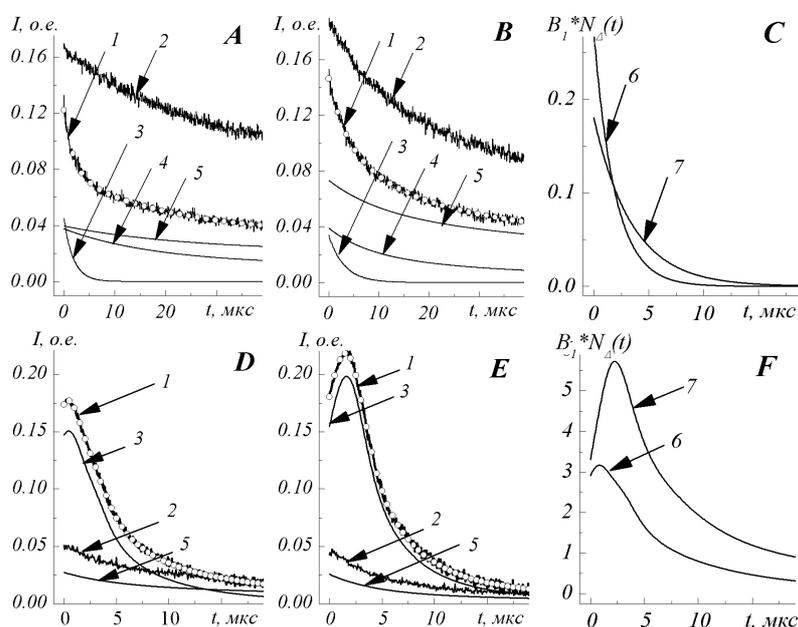


Рисунок 2. Разложение кинетики замедленной флуоресценции (1) на составляющие, обусловленные синглет-триплетной аннигиляцией (3), триплет-триплетной аннигиляцией (4) и термоактивированной замедленной флуоресценцией (5) в атмосфере азота (верхний ряд) и при естественном воздухе (нижний ряд); (2) – фосфоресценция; вставки A и D – здоровая ткань, вставки B и E – опухоль. Кружками показана аппроксимация 3Φ . На вставках C и F кривые 6 и 7 – изменение концентрации синглетного кислорода в нормальной ткани и в опухоли соответственно.

брану клетки. В этих условиях концентрация кислорода внутри разных клеток должна определяться только его внешним парциальным давлением и растворимостью в цитоплазме.

Таким образом, заметное увеличение $B_1 * N_{\Delta}(t)$ в пораженных тканях по сравнению с нормальными (вставка **F** на рис. 2) обусловлено не разной исходной концентрацией кислорода в клетках, а более благоприятными условиями для образования синглетного кислорода и процессов *СТА*. Однако обратное соотношение эффективности *СТА* в этих же образцах при пониженной концентрации кислорода (табл. 1 и вставка **C** на рис. 2) не соответствует этому предположению.

С учетом этих противоречивых обстоятельств можно дать следующую интерпретацию полученных результатов. По-видимому, наблюдаемые сигналы 3Φ обусловлены суперпозицией свечения молекул красителя адсорбированных мембраной, связанных внутри- и межклеточными белками, и молекул, растворенных в цитоплазме. При естественном воздухе над образцами кислород успевает «потушить» триплетные возбуждения молекул красителя в цитоплазме еще до «отпирания» ФЭУ и начала регистрации сигналов. При этом экспериментально фиксируется

только 3Φ от красителя, связанного белками и находящегося в мембране, где подвижность кислорода и доступность красителя для него значительно меньше.

Обнаруженные различия в ходе $B_1 * N_{\Delta}(t)$ и в характеристиках 3Φ в разных тканях при большой концентрации кислорода скорее обусловлены отличиями в свойствах их мембран, внутри- и межклеточных белков. В этих условиях кинетика 3Φ определяется в основном процессами синглет-триплетной аннигиляции и $T3\Phi$ связанных люминофоров. Этот вывод подтверждается отсутствием в наблюдаемом сигнале 3Φ вклада от *ТТА*, которая у связанных люминофоров и должна быть полностью «выключена». Изменения мембран и внутриклеточного состава в патогенных тканях установлены в ряде работ [26-32].

При малой концентрации кислорода экспериментально регистрируется 3Φ как связанных белками, так и растворенных в цитоплазме молекул красителя, что приводит к другим значениям B_2 и B_3 и, возрастанию роли *ТТА* в 3Φ . Об участии в формировании общего сигнала диффузионно-подвижных молекул красителя в цитоплазме свидетельствует заметный интегральный вклад *ТТА* в 3Φ (таблица 1).

29.09.2012

Работа выполнена при поддержке гранта 1.1.11 (тем. план задания Минобрнауки) с использованием оборудования ЦКП ИМНТ ОГУ.

Список литературы:

1. Floor A. Harms, Wadim M. de Boon, Gianmarco M. Balestra, Sander I. A. Bodmer and other, Oxygen-dependent delayed fluorescence measured in skin after topical application of 5-aminolevulinic acid // *Biophotonics*. 2011. P. 1-9.
2. Mikako Ogawa, Celeste A.S. Regino, Jurgen Seidel and other, Dual-modality molecular imaging using antibodies labeled with activatable fluorescence and a radionuclide for specific and quantitative targeted cancer detection // *Bioconjugate Chem.*, Vol. 20, No 11, 2009, P. 2177-2184.
3. Рогаткин Д.А. Лазерная клиническая диагностика как одно из перспективных направлений биомедицинской радиоэлектроники // *Медицина и биотехнология*. 1998. № 3. – С. 34.
4. Claudia Chilom, Doina Gazdaru, Maria Iuliana Cruia and other, Absorption and fluorescence modifications of tumoral tissue proteins // *Romanian J. Biophys.*, Vol. 17, No. 3, Bucharest, 2007 – P. 185-193.
5. Ermilov E. A., Markovskii O. L. and Gulis I. M., Inductive-resonant triplet-triplet annihilation in solid solutions of erythrosine // *Journal of Applied spectroscopy*, Vol. 64, No. 5, 1997. – P. 642-645
6. Летута С.Н., Маряхина В.С., Пашкевич С.Н., Рахматуллин Р.Р. Длительная люминесценция органических красителей в клетках биологических тканей // *Оптика и спектроскопия*, 2011, том 110, № 1, С. 72–75.
7. Летута С.Н., Маряхина В.С., Рахматуллин Р.Р. Оптическая диагностика клеток биологических тканей в процессе их культивирования в полимерных средах // *Квантовая электроника*, 2011, Т. 41, № 4, С. 314-317.
8. Летута С.Н., Маряхина В.С., Пашкевич С.Н., Рахматуллин Р.Р. Кинетика длительной люминесценции молекулярных зондов в клетках биологических тканей // *Вестник ОГУ – 2011. – №1, С. 182-186.*
9. Moiseeva E. V. Original Approaches to Test Anti-breast Cancer Drugs in a Novel Set of Mouse Models. Proefschrift Universiteit Utrecht, 2005. P. 191.
10. Герасимова М. А., Сизых А.Г., Кудряшева Н. С. Хроноскопическое исследование взаимодействия ксантеновых красителей с ферментами: бактериальной люциферазой и НАДН: ФМН-оксидоредуктазой // *Вестник КрасГУ. Серия физ.-мат. науки*. 2005: Вып. 1. С. 58-70.
11. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. 277 с.
12. Matthews E. K. and Mesler D.E. Photodynamic effects of erythrosine on the smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli // *J. Pharmac.* Vol. 83, 1984. – P. 555-566.
13. 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. № 5. P. 1877-1882.

14. Кучеренко М.Г., Кецле Г.А., Мельник М.П., Летута С.Н. Изменение кинетики аннигиляционной люминесценции красителей в полимерах под действием лазерного импульса// Оптика и спектроскопия– 1995. Т.78. с. 649.
15. Letuta S.N., Kuvandykova A.F., Pashkevich S.N. The kinetics of exogenous phosphors delayed fluorescence in tissues // Journal of Analytical Oncology, 2012, Vol. 1, №1, p. 107-110.
16. Rohatgi-Mukherjee K.K., Mukhopadhyay A.K. Photophysical processes in halofluorescein dyes // Indian J. of Pure and Applied Phys. 1976. V. 14. № 6. P. 481-484.
17. Charles Margraves, Kenneth Kihm, Sang Youl Yoon and other, Simultaneous measurements of cytoplasmic viscosity and intracellular vesicle sizes for live human brain cancer cells// Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108, No. 10, October, 2011.
18. Tomasz Kalwarczyk, Natalia Ziebac, Anna Bielejewska and other, Comparative analysis of viscosity of complex liquids and cytoplasm of mammalian cells at the nanoscale// NanoLett, 11, 2011 – p. 2157-2163.
19. Bicknese S., Periasamy N., Shohet S. B., and Verkman A.S. Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: measurement by evanescent field frequency – domain microfluorimetry// Biophysical Journal, Vol. 65, September 1993 – p. 1272-1282.
20. Yasuo Hashimoto and Naomi Shinozaki, Measurement of cytoplasmic viscosity by fluorescence polarization in phytohemagglutinin – stimulated and unstimulated human peripheral lymphocytes// The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 36, No. 6, p. 609-613, 1988.
21. Andrea M. Mastro, Mihael A. Babich, William D. Taylor, and Alec D. Keith, Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells// Journal of Cell Biology, Vol. 81, June 1984. – p. 3414-3418.
22. Atlante A., Calissano P., Bobba A and other, Cytochrome C is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS) – dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death// J. Biol. Chem., №24, 2000. – p. 275.
23. Julio F. Turrens Mitochondrial formation of reactive oxygen species// Journal of Physiology, Vol. 552, № 2, 2003. – p. 335-444.
24. Чеснокова Н. П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы// Современные наукоемкие технологии, № 6, 2006. – с. 28-34.
25. Чеснокова Н. П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем// Успехи современного естествознания, № 7, 2006. – с. 37-41.
26. Stern R.G., Milestone B.N., Gatenby R.A., Carcinogenesis and the plasma membrane // Medical Hypotheses, Vol. 52, № 5, 1999. – p. 367-372.
27. Barbara Szachowicz-Petelska, Izabela Dobizynska, Stanislaw Sulkowski and Zbigniew Eigaszewski, Characterization of the cell membrane during cancer transformation // Journal of Environmental Biology, Vol. 31, № 5, September 2010. – p. 845-850.
28. Голованов М.Г. Биофизическая структура внешнего слоя плазматической мембраны опухолевых клеток (гликокаликса) // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, т. 17, № 1, 2006.
29. Jinyi Wang, Zong Fang Wan, Wenming Lui and other, Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs // Biosensors and Bioelectronics, Vol. 25, 2009. – p. 721-727.
30. Kiyohide Kojima Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells // J. Med. Sci., Vol. 56, 1993. – p. 1-18.
31. James K. Selkirk, Elwood J. C., and Morris H. P., Study on the proposed role of phospholipid in tumor cell membrane// Cancer Research, Vol. 31, January 1971. – p. 27-31.
32. Ora A. Weisz Organelle acidification and disease// Backwell Munksgaard, 2003, Vol. 4, p. 57-64.

Сведения об авторах:

Летута С.Н., проректор по научной работе Оренбургского государственного университета,
доктор физико-математических наук, профессор

Кувандыкова А.Ф., аспирантка физического факультета
Оренбургского государственного университета

Пашкевич С.Н., директор ЦКП ИМНТ Оренбургского государственного университета,
кандидат физико-математических наук, доцент

Салецкий А.М., заведующий кафедрой физики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова,
доктор физико-математических наук, профессор

UDC 535.37:577.3.043:537.531

Letuta S.N., Kuvandykova A.F., Pashkevich S.N, Saletskiy A.M.

LASER INITIALIZATION OF DELAYED FLUORESCENCE OF EXOGENOUS FLUOROPHORES IN BIOLOGICAL TISSUES

There have been represented the investigation results of kinetics peculiarities of delayed fluorescence (DF) and phosphorescence of exogenous fluorophores (molecules of organic stain) in biological tissues. There are discussed possible reasons of differences between DF obtained curves and probes of healthy and pathogenic tissues stained by erythrosine in vitro.

Key words: fluorescence, phosphorescence, investigation of biological tissues.