

НЕПРЕРЫВНЫЙ МОНИТОРИНГ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОРОДА В ТКАНЯХ *in vivo*

© 2018 г. С.Н. Летуга, А.Т. Ишемгулов, У.Г. Летуга, С.Н. Пашкевич

Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург, просп. Победы, 13

E-mail: ppsnya@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.18 г.

Исследована кинетика замедленной флуоресценции и фосфоресценции ксантеновых красителей в тканях мышей *in vivo* и *in vitro* при импульсно-периодическом возбуждении молекул. Продемонстрированы преимущества непрерывного мониторинга содержания кислорода в тканях по кинетике замедленной флуоресценции, обусловленной синглет-триплетной аннигиляцией синглетного кислорода с триплетным возбуждением флуорофора. Предложен способ определения времени восстановления содержания кислорода, расходуемого в тканях при фотодинамических процессах *in vivo* и *in vitro*.

Ключевые слова: кислород, биологические ткани, ксантеновые красители, длительная люминесценция.

DOI: 10.1134/S0006302918050186

Кислород – непосредственный участник жизненно важных для организмов окислительно-восстановительных реакций. Контроль содержания кислорода в различных тканях позволяет оценивать состояние организма в целом и прогнозировать развитие метаболических процессов. Долгое время для определения парциального давления кислорода в тканях не было альтернативы полярографическим методам с использованием игольчатых электродов [1].

С развитием оптических (спектрофотометрических) методов анализа получила распространение оксигеметрия, основанная на различиях в поглощении света в крови производными гемоглобина (см. работу [2] и приведенные там ссылки). В этой методике парциальное давление кислорода в ткани определяется опосредованно по содержанию оксигемоглобина в крови. Сведения о динамике изменения концентрации кислорода в тканях могут быть получены с помощью усовершенствованного варианта оксигеметрии – пульсоксиметрии, которая позволяет непрерывно неинвазивно исследовать артериальную кровь. Разработка метода пульсоксиметрии, несомненно, стала крупным событием в непрерывном исследовании оксигенации крови, но у этого метода есть свои недостатки, характерные для любых амплитудных измерений. К ним относятся огра-

ниченная чувствительность к концентрации кислорода, обусловленная спецификой кривой диссоциации оксигемоглобина, зависимость поглощения от температуры и pH и др.

Альтернативой спектрофотометрическим измерениям при определении концентрации кислорода в тканях может быть времяразрешенная люминесценция флуорофоров, время жизни которой зависит от концентрации кислорода, выступающего тушителем возбуждений. Известным примером является реализованное в коммерческих приборах применение погружаемого в ткань (или иную среду) световода, на конце которого имеется датчик в виде силиконовой пленки, допированной комплексами переходных металлов [3–5]. Основным недостатком этой методики, на наш взгляд, является неопределенность, связанная с различием в концентрациях кислорода в датчике и среде.

В настоящей работе в качестве молекулярных люминесцентных сенсоров кислорода в тканях предлагается использовать экзогенные флуорофоры, окрашивая ими непосредственно исследуемый участок ткани. При этом в силу совпадения локализаций, гарантируется полное соответствие реакции сенсора на присутствие кислорода в образце.

Экзогенные флуорофоры широко используются для флуоресцентной диагностики или в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ) [6–10]. Для детектирования кислорода в ткани с их помощью удоб-

Сокращения: ФДТ – фотодинамическая терапия, ЗФ – замедленная флуоресценция.

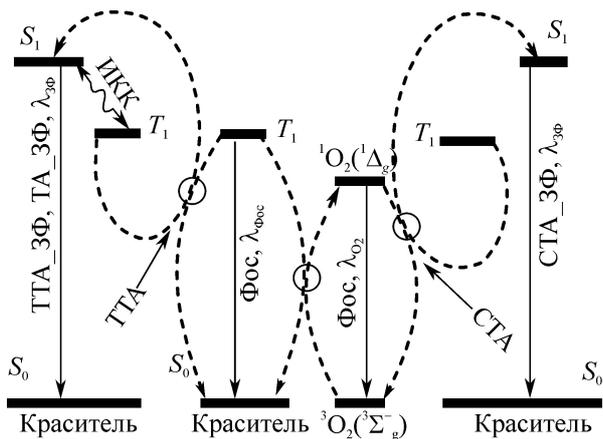


Рис. 1. Внутри- и межмолекулярные переходы с участием молекул красителей и кислорода в тканях.

но, в отличие от работ [1,3–5], регистрировать динамические характеристики длительной люминесценции – замедленной флуоресценции (ЗФ) и фосфоресценции, природа которых непосредственно связана с долгоживущими триплетными возбуждениями. Исследовать долгоживущие триплетные состояния флуорофоров целесообразно потому, что они подвержены влиянию окружения в большей степени, чем синглетные, т.е. чувствительность триплетных состояний молекул к изменению концентрации кислорода в окружении много выше, чем у синглетных. Переход от спектральных измерений к кинетическим освобождает от необходимости учитывать сильное рассеяние света в тканях, снижает зависимость результата измерения от концентрации флуорофора, параметров возбуждения и других факторов, сопровождающих амплитудные измерения в биологических системах.

Замедленная флуоресценция в молекулах возникает при излучательных переходах типа $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$, когда возбужденные синглетные S_1 -состояния образуются в процессах с участием ансамбля триплетных T_1 -возбуждений молекул. Известны три таких механизма образования возбужденных синглетных S_1 -состояний (рис. 1). Если разность энергий S_1 - и T_1 -уровней молекулы невелика, например, в ксантеновых красителях, то S_1 -состояния молекул возникают за счет термоактивированной обратной интеркомбинационной конверсии ($T_1 \rightarrow S_1$). По классификации [11] такая ЗФ называется замедленной флуоресценцией типа Е. В средах с диффузионно-подвижными частицами возможна триплет-триплетная аннигиляция двух молекул. Образующийся при этом триплет-триплетный комплекс с конечной вероятностью распадается с образованием S_1 -состояний молекул:

$T_1 + T_1 \rightarrow S_1 + S_0$. Наконец, в системах, содержащих кислород, возможна двухстадийная реакция образования S_1 -состояний молекул $T_1 + ^3O_2 \rightarrow S_0 + ^1O_2$ и $T_1 + ^1O_2 \rightarrow S_1 + ^3O_2$, где 3O_2 и 1O_2 – основное и синглетное состояния молекулы кислорода соответственно. Процесс ($T_1 + ^1O_2$) называют синглет-триплетной аннигиляцией [12–19].

В работах [20,21] показано, что в тканях животных ксантеновые красители находятся преимущественно в связанном состоянии, их подвижность ограничена и в формировании кинетики экспериментально наблюдаемой ЗФ дают вклад только термоактивированная обратная интеркомбинационная конверсия и синглет-триплетная аннигиляция.

Если миграция молекул 3O_2 в среде достаточно эффективна, пространственное распределение реагентов несущественно и можно воспользоваться формально-кинетическим описанием кинетики ЗФ. Интенсивность ЗФ молекул в таком приближении определяется следующим выражением [17,22]:

$$I_{ЗФ}(t) = \Phi_{фл} K_{\Delta} p_S n_T(t) n_{\Delta}(t) + \Phi_{фл} K_{T_1 S_1} n_T(t). \quad (1)$$

Первое слагаемое в выражении (1) определяет аннигиляционную составляющую люминесценции, а второе – термоактивированную. Через K_{Δ} и $K_{T_1 S_1}$ обозначены константы скоростей ($T_1 + ^1O_2$) аннигиляции и обратной ($T_1 \rightarrow S_1$) интеркомбинационной конверсии, $\Phi_{фл}$ – квантовый выход флуоресценции, p_S – вероятность генерации состояний S_1 молекул в реакции аннигиляции ($T_1 + ^1O_2$). Константа скорости перехода из нижнего триплетного состояния T_1 в синглетное S_1 имеет термоактивационный характер:

$$K_{T_1 S_1}(T) = K_{T_1 S_1}^{\infty} \exp(-\Delta E/kT), \quad K_{T_1 S_1}^{\infty} = K_{T_1 S_1},$$

где ΔE – синглет-триплетное расщепление.

Вклад второго слагаемого в (1) при нормальных условиях невелик, а закон дезактивации $n_T(t)$ может быть найден путем измерения кинетики затухания фосфоресценции. Заметим, что интенсивность фосфоресценции молекул монотонно уменьшается.

Решение системы нелинейных уравнений для n_T и n_{Δ} удастся получить аналитически в случае

$$\alpha = \tau_T^{-1} + K_{O_2} n_{O_2} > (K_{\Delta} + K_{O_2}) n_{\Delta},$$

где K_{O_2} – константа скорости реакции $T_1 + ^3O_2 \rightarrow S_0 + ^1O_2$, K_{Δ} – константа скорости аннигиляции

($T_1 + {}^1\text{O}_2$), n_{O_2} – концентрация кислорода в ткани. В этом приближении $n_T(t)$ представляет собой экспоненциальную функцию с показателем $(-\alpha t)$, а кинетика $n_\Delta(t)$ параметрически зависит от начальной концентрации возбуждений T_1 .

При ФДТ, основанной на совместном действии фотосенсибилизаторов и света на опухоли, важно обеспечить локальность фотодинамического повреждения опухоли. Это достигается селективностью накопления в ней фотосенсибилизаторов и адресным лазерным облучением. Но при воздействии излучения на опухоли в процессе ФДТ неизбежно облучаются и здоровые ткани с непредсказуемыми последствиями для организма. Для решения проблемы требуется не только точно диагностировать границы опухоли, но и минимизировать воздействие лазерного облучения на организм, ограничившись только строго необходимой эффективной дозой. Для определения такой дозы требуется непрерывный контроль потребления тканью синглетного кислорода.

В настоящей работе представлены результаты исследования длительной люминесценции экзогенных фотосенсибилизаторов в тканях животных *in vivo*. Показано, что по кинетике длительной люминесценции можно непрерывно отслеживать динамику изменения содержания кислорода в тканях в реальном времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили злокачественные опухоли и нормальные эпителиальные и мышечные ткани мышей линии BYRB. Отличительная особенность мышей линии BYRB в том, что у самок этой линии, давших потомство, на определенной стадии их жизненного цикла спонтанно возникает рак молочной железы [23].

Для экспериментов *in vitro* животных оперировали, и свежие образцы тканей (время между окончанием операции и завершением измерений не превышало 30 мин) окрашивали путем погружения на две–три минуты в водный раствор красителя исходной концентрации 10^{-3} моль/л. После окрашивания образцы помещали в специальную камеру, к которой при необходимости подключали баллон с газообразным азотом для регулирования концентрации кислорода в атмосфере над образцами.

В экспериментах *in vivo* у животных вскрывали небольшой участок кожи с последующим окрашиванием ткани. Для предотвращения прямого доступа воздуха в ткань из атмосферы открытый участок ткани плотно накрывали стеклянной пластиной.

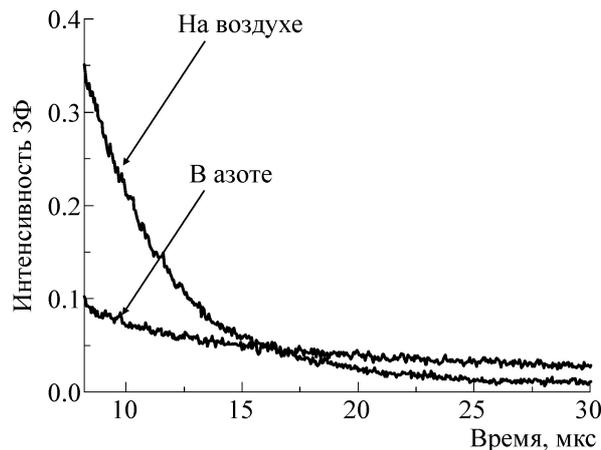


Рис. 2. Кинетические кривые затухания 3Ф эритрозина в ткани молочной железы мыши в воздухе и в атмосфере азота.

Ткани окрашивали ксантоновыми красителями (эритрозин, эозин, бенгальский розовый), которые широко применяются в гистологии, а также используются в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ. Ксантоновые красители хорошо окрашивают внеядерные структуры клеток и селективно связываются с белками [24,25]. Они имеют высокий выход в триплетное состояние и небольшое синглет-триплетное расщепление ($\Delta E < 3000 \text{ см}^{-1}$) [26].

Молекулы красителей возбуждали излучением второй гармоники ($\lambda_{\text{возб}} = 532 \text{ нм}$) твердотельного YAG:Nd³⁺-лазера с плотностью мощности $P < 0,5 \text{ МВт/см}^2$, длительностью импульса 15 нс и регулируемой частотой следования импульсов в диапазоне 0–10 Гц. Длительную люминесценцию молекул регистрировали фотоэлектронным умножителем ФЭУ-84 с управляющим электродом через монохроматор МДР-41. С помощью управляющего электрода путем подачи на него «запирающего» импульса отрицательной полярности ($\sim 100 \text{ В}$), чувствительность ФЭУ в момент возбуждения понижали на несколько порядков. Свечение красителей регистрировали в диапазонах длин волн $\lambda = 560\text{--}580 \text{ нм}$ (3Ф) и $\lambda = 670\text{--}690 \text{ нм}$ (фосфоресценция). Все измерения проводили при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика затухания 3Ф эритрозина в ткани молочной железы мыши при различном содержании кислорода в атмосфере над исследуемым образцом, показана на рис. 2. В обычной атмосфере в интервале времени 0–10 мкс 3Ф

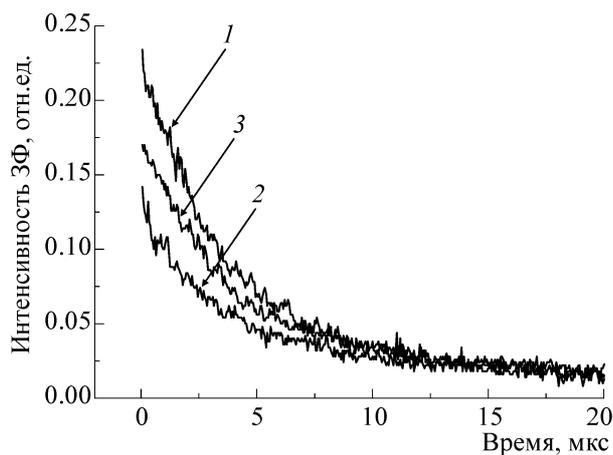


Рис. 3. Кинетические кривые затухания 3Ф эозина в опухоли молочной железы мыши *in vitro* при возбуждении молекул серией импульсов с частотой 10 Гц: 1 — после первого импульса, 2 — после седьмого импульса, 3 — кинетическая кривая после седьмого импульса, записанная с задержкой 2 с.

представляет собой суперпозицию термостимулированного и аннигиляционного свечения. Интенсивность свечения быстро убывает и примерно через 15 мкс вид кинетической кривой 3Ф полностью определяется мономолекулярными термостимулированными процессами (вторым слагаемым уравнения (1)). В атмосфере азота $n_{\Delta}(t) = 0$ и наблюдается только замедленная флуоресценция типа Е, кинетическая кривая становится моноэкспоненциальной с временем жизни около 400 мкс. Интенсивность 3Ф в интервале 0–10 мкс существенно уменьшается, а на временах больше 15 мкс — увеличивается.

Эти закономерности 3Ф необходимо учитывать при количественном анализе кинетики свечения. Поскольку интенсивность свечения определяется площадью под кинетической кривой, то для корректной оценки этой величины необходимо указывать временной интервал, на котором измеряется площадь под кинетической кривой.

При возбуждении молекул красителей в тканях мышей не одиночными импульсами, а серией импульсов, следующих с частотой выше 1 Гц, происходит тушение аннигиляционной 3Ф (рис. 3).

Этот эффект преимущественно наблюдается в злокачественных опухолях и назван световым тушением 3Ф [27]. Тушение 3Ф происходит потому, что после каждого импульса возбуждения красителей часть растворенного в цитозоле кислорода фотосенсибилизированно переходит в активную форму (образуется синглетный кислород 1O_2) и необратимо расходуется

на окисление окружения. Если возбуждающие импульсы следуют друг за другом с малым ($\sim 0,2$ с) периодом времени, то концентрация кислорода в тканях за счет диффузии извне (*in vitro*) или из кровотока (*in vivo*) не успевает полностью восстановиться к моменту прихода каждого следующего импульса. В результате от импульса к импульсу интенсивность аннигиляционной 3Ф уменьшается, при этом отличие каждой последующей кинетической кривой от предыдущей отражает потребление (расход) кислорода на фотодинамическое действие. Заметим, что одновременно с уменьшением интенсивности аннигиляционной 3Ф происходит рост интенсивности 3Ф типа Е и флуоресценции красителей, а также увеличивается длительность свечения. Относительные изменения интенсивности 3Ф и длительности свечения представлены в таблице.

Процесс светового тушения 3Ф обратим. В условиях *in vitro* за счет диффузии из атмосферы исходное содержание кислорода в тканях восстанавливается примерно через 5–8 с. Поэтому если возбуждающие импульсы в серии следуют друг за другом с частотой, меньшей 0,2 Гц, эффект светового тушения 3Ф не наблюдается.

Обратимость процесса тушения 3Ф позволяет построить кривые восстановления содержания кислорода в тканях. Если после окончания последнего возбуждающего импульса серии воздействовать на окрашенную ткань одиночным «контрольным» импульсом с заданной задержкой во времени, то можно проследить, насколько «контрольная» кинетическая кривая приблизилась к исходной кривой после первого импульса. Если задержка достаточно велика (в наших экспериментах больше 5 с), то контрольная кривая совпадет с кривой от первого импульса, так как концентрация кислорода в ткани успеет восстановиться. Если задержка мала, то «контрольная» кривая, наоборот, будет близка к кривой от последнего импульса в серии. Для промежуточного значения задержки на рис. 3 показана «контрольная» кинетическая кривая, записанная через 2 с после окончания серии возбуждения из семи импульсов с частотой 10 Гц.

На рис. 4 приведены кривые восстановления интенсивности аннигиляционной части 3Ф (0–10 мкс) эритрозина в тканях *in vivo* и *in vitro* после «подавления» 3Ф семью импульсами. По оси абсцисс отложено время задержки контрольного импульса относительно последнего импульса в серии возбуждения. Ординаты точек соответствуют интенсивности «контрольной» кинетической кривой, нормированной на интенсивность от первого возбуждающего им-

Изменение интенсивности и длительности аннигиляционной замедленной флуоресценции эритрозина в опухоли молочной железы мыши при импульсно-периодическом возбуждении с частотами 5 и 10 Гц

№ импульса возбуждения	Частота следования возбуждающих импульсов 5 Гц		Частота следования возбуждающих импульсов 10 Гц	
	I_p/I_1	t , мкс	I_p/I_1	t , мкс
1	1,00 ± 0,03	2,54 ± 0,08	1,00 ± 0,04	2,50 ± 0,06
2	0,85 ± 0,02	2,62 ± 0,06	0,72 ± 0,04	2,98 ± 0,08
3	0,78 ± 0,03	2,76 ± 0,07	0,68 ± 0,03	3,11 ± 0,07
4	0,75 ± 0,04	2,85 ± 0,08	0,66 ± 0,04	3,13 ± 0,07
7	0,70 ± 0,03	2,99 ± 0,08	0,61 ± 0,04	3,17 ± 0,09
10	0,67 ± 0,04	3,10 ± 0,10	0,60 ± 0,04	3,20 ± 0,08

пульса. Концентрация кислорода и аннигиляционная ЗФ не прямо пропорциональны, однако из рис. 4 видно, что восстановление исходной концентрации кислорода из кровотока *in vivo* происходит за две–три секунды, т.е. существенно быстрее, чем за счет диффузии из атмосферы.

Используя соответствие аннигиляционной части ЗФ концентрации кислорода в окрашенной ткани, можно непрерывно контролировать изменения содержания кислорода в тканях. На рис. 5 представлен пример такого мониторинга для мышечной ткани здоровой мыши *in vivo* по ЗФ эритрозина, возбуждаемой лазерными импульсами с частотой 10 Гц. Эффект светового тушения ЗФ в таких тканях не наблюдается. Содержание кислорода в тканях изменяли путем подачи кислорода в кислородную маску мыши и его отключения. На рис. 5а показана типичная кривая ЗФ и указаны площади S1 и S2, соответствующие интенсивности ЗФ на участках 0–10 мкс (аннигиляционная часть ЗФ) и 30–40 мкс (термоактивационная часть ЗФ). По оси ординат на рис. 5б отложена интегральная (по площади) интенсивность ЗФ молекул эритрозина в мышечной ткани мыши. Верхняя кривая (обозначена как S1) показывает изменение интенсивности аннигиляционной ЗФ эритрозина (изменение площади S1 под кинетической кривой ЗФ в интервале времени 0–10 мкс), нижняя кривая (обозначена как S2) – изменение интенсивности ЗФ типа Е (площадь S2 под кривой ЗФ в интервале времени 30–40 мкс). Указанные площади под участками кинетической кривой ЗФ выделены заливкой и обозначены на рис. 5а как S1 и S2. Темными стрелками обозначено начало подачи кислорода в кислородную маску мыши, светлыми стрелками – момент отключения подачи кислорода.

При подаче кислорода интенсивность аннигиляционной ЗФ увеличивается, а интенсив-

ность ЗФ типа Е уменьшается. Через 2,5 с после начала подачи кислорода интенсивности ЗФ выходят на насыщение и в интервале 5–10 с не изменяются. Это свидетельствует о насыщении тканей кислородом (достигнут предел растворимости кислорода). После отключения подачи кислорода примерно через 3,5 с интенсивности ЗФ восстанавливаются до первоначальных значений. При повторной подаче и отключении кислорода картина изменения интенсивностей ЗФ повторяется. Виден тренд общего снижения интенсивности свечения, что, по-видимому, связано с фотохимическим выгоранием красителя.

Мониторинг изменения содержания кислорода в тканях можно осуществлять и по фосфоресценции красителей [28,29]. На рис. 6 показано изменение интенсивности фосфоресценции эритрозина в том же самом эксперименте. Интенсивность фосфоресценции, в отличие от ЗФ, меняется монотонно вне зависимости от

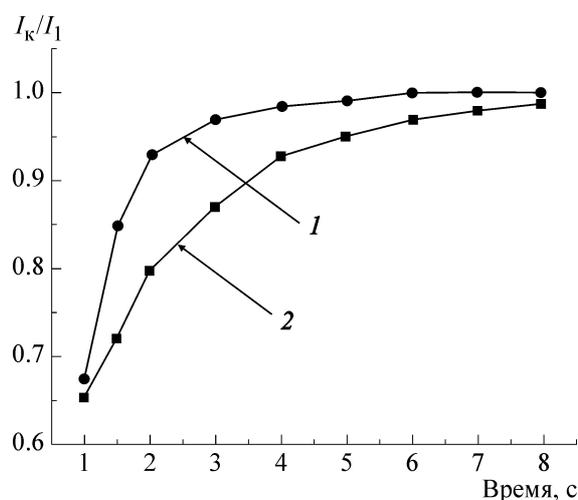


Рис. 4. Кривые восстановления аннигиляционной части интенсивности ЗФ эритрозина в тканях мышцей *in vivo* (1) и *in vitro* (2).

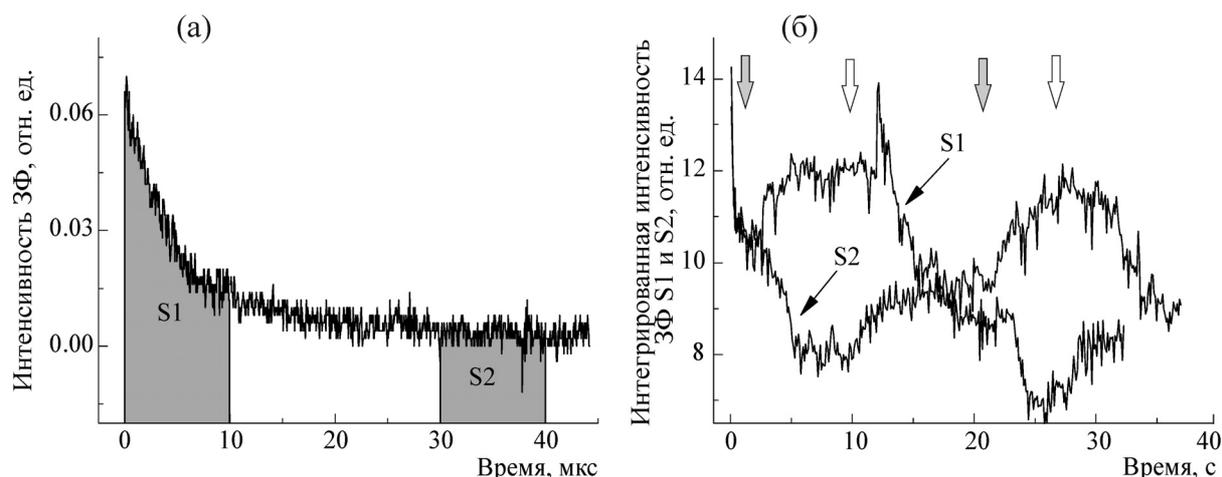


Рис. 5. (а) – Иллюстрация способа измерения аннигиляционной части 3Ф (S1) и термоактивационной части 3Ф (S2). (б) – Изменение интенсивности 3Ф эритрозина в мышечной ткани мыши *in vivo* при импульсно-периодическом возбуждении с частотой 10 Гц. Темные стрелки указывают начало подачи кислорода в кислородную маску мыши, светлые стрелки – отключение подачи кислорода.

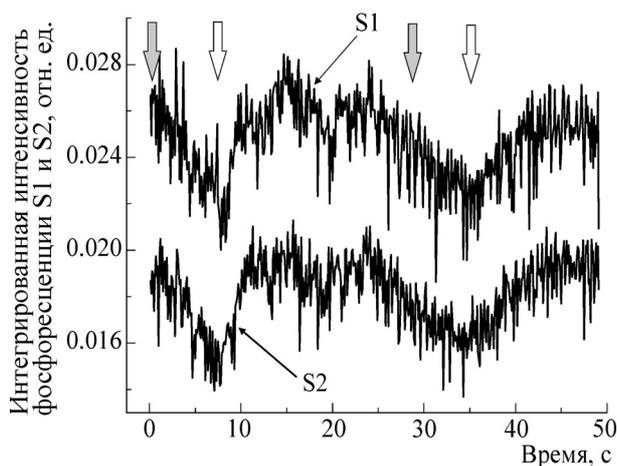


Рис. 6. Изменение интенсивности фосфоресценции эритрозина в мышечной ткани мыши *in vivo* при импульсно-периодическом возбуждении с частотой 10 Гц. Темные стрелки указывают начало подачи кислорода в кислородную маску мыши, светлые стрелки – отключение подачи кислорода. Верхняя кривая – изменение площади S1 под кинетической кривой в интервале времени 0–10 мкс, нижняя – изменение площади S2 в интервале времени 30–40 мкс.

временного интервала, на котором вычисляется площадь под кинетической кривой. С ростом концентрации кислорода интенсивность свечения на любом временном интервале уменьшается. Темными стрелками на рис. 6 показано начало подачи кислорода в кислородную маску мыши, светлыми стрелками – отключение кислорода. Отчетливо видны закономерные изменения интенсивности свечения. С ростом концентрации кислорода в ткани интенсивность

фосфоресценции уменьшается, что обусловлено тушением триплетных состояний молекул красителя. При отключении подачи кислорода примерно через 3,5 с содержание кислорода в ткани нормализуется. Этот процесс обратим, и при повторной подаче кислорода процессы тушения и восстановления интенсивности фосфоресценции повторяются. Следует отметить, что изменения интенсивности фосфоресценции менее выражены, чем у замедленной флуоресценции, особенно по сравнению с ее аннигиляционной частью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По кинетике 3Ф или фосфоресценции экзогенных флуорофоров при импульсно-периодическом возбуждении молекул возможен непрерывный мониторинг изменения содержания кислорода в тканях *in vivo*. Интенсивность 3Ф, особенно ее составляющая, обусловленная синглет-триплетной аннигиляцией синглетного кислорода с триплетным возбуждением флуорофора, более чувствительна к изменению содержания кислорода в тканях. Такой способ контроля содержания кислорода и его расхода в результате фотодинамических процессов особенно полезен при ФДТ, поскольку мониторинг можно проводить одновременно с сеансом терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 3.6358.2017/БЧ и Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 17-32-50051.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Dings, J. Meixensberger, A. Jäger, and K. Roosen, *Neurosurgery* **43** (5), 1082 (1998).
2. И. А. Шурыгин, *Мониторинг дыхания. Пульсоксиметрия, капнография, оксиметрия* (БИНОМ, Москва, 2000).
3. J. R. Bacon and J. N. Demas, *Anal. Chem.* **59** (23), 2780 (1987).
4. D. R. Collingridge, W. K. Young, B. Vojnovic, et al., *Radiat. Res.* **147** (3), 329 (1997).
5. W. K. Young, B. Vojnovica, and P. Wardman, *Br. J. Cancer* **74** (Suppl. XXVII), S256 (1996).
6. А. А. Красновский (мл.), *Биофизика* **49** (2), 305 (2004).
7. T. Nyokong and V. Ahsen, *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security* (Springer, Dordrecht, 2012).
8. Y. Shen, H. Lin, Z. Huang, et al., *Laser Phys. Lett.* **8**, 232 (2011).
9. E. G. Mik, T. Johannes, C. J. Zuurbier, et al., *Biophys. J.* **95**, 3977 (2008).
10. S. N. Letuta, A. F. Kuvandykova, and S. N. Pashkevich, *J. Anal. Oncology* **1** (1), 107 (2012).
11. С. Паркер, *Фотолуминесценция растворов* (Мир, Москва, 1972).
12. С. Н. Летута, В. С. Маряхина, С. Н. Пашкевич и Р. Р. Рахматуллин, *Оптика и спектроскопия* **110** (1), 72 (2011).
13. K. Jahn, V. Buschmann, C. Hille, *Scientific Reports* **5**, 14334 (2015).
14. I. S. Vinklarek, M. Scholz, R. Dedic, and J. Hala, *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 507 (2017).
15. M. Scholz, A.L. Biehl, R. Dëdic, and J. Hála, *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 700 (2015).
16. M. Scholz and R. Dëdic, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Ed. by S. Nonell and C. Flors (Roy. Soc. of Chemistry, 2016), Vol. 2, Chapt. 28, pp. 63–81.
17. М. Г. Кучеренко, М. П. Мельник, Г. А. Кедре и С. Н. Летута, *Оптика и спектроскопия* **78** (4), 649 (1995).
18. А. А. Krasnovsky Jr., *Biochemistry* **72** (10), 1065 (2007).
19. С. Н. Летута, А. Т. Ишемгулов, С. Н. Пашкевич и др., *Вестн. ОГУ* **13**, 175 (2015).
20. С. Н. Летута, А. Ф. Кувандыкова, С. Н. Пашкевич и А. М. Салецкий, *Журн. физ. химии* **87** (9), 1602 (2013).
21. А. Т. Ишемгулов, С. Н. Летута, С. Н. Пашкевич и др., *Оптика и спектроскопия* **123** (5), 818 (2017).
22. М. Г. Кучеренко, *Кинетика нелинейных фотопроцессов в конденсированных молекулярных системах* (Изд-во ОГУ, Оренбург, 1997).
23. E. V. Moiseeva, *Original Approaches to Test Anti-breast Cancer Drugs in a Novel Set of Mouse Models*. (Proefschrift Universiteit, Utrecht, 2005).
24. A. Townshend, D. T. Burns, R. Lobinski, et al., *Dictionary of Analytical Reagents* (CRC Press, 1993).
25. H. S. Soedjak, *Anal. Biochem.* **220**, 142 (1994).
26. K. K. Rohatgi-Mukherjee and A. K. Mukhopadhyay, *Ind. J. Pure Appl. Phys.* **14** (6), 481 (1976).
27. S. N. Letuta, S. N. Pashkevich, A. T. Ishemgulov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **163**, 232 (2016).
28. Y. Hirakawa, *Sci. Rep.* **5**, 17838 (2015).
29. S. V. Apreleva, D. F. Wilson, and S. A. Vinogradov, *Appl. Opt.* **45** (33), 8547 (2006).

In vivo Continuous Monitoring of Oxygen Content in Tissues

S.N. Letuta, A.T. Ishemgulov, U.G. Letuta, and S.N. Pashkevich

Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

The kinetics of delayed luminescence and phosphorescence of xanthene dyes in mouse tissues under the effect of pulse-periodic laser radiation was studied *in vivo* and *in vitro*. The advantages of continuous monitoring of oxygen concentration in tissues by the kinetics of delayed fluorescence as a result of singlet-triplet annihilation of singlet oxygen with triplet excitation of fluorophore were demonstrated. The method of determining the time of recovery of the content of consumed oxygen in tissues *in vivo* and *in vitro* in photodynamic processes is proposed.

Keywords: oxygen, tissues, xanthene dyes, delayed luminescence