

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ФАНТОМА ДЛЯ ДИФФУЗИОННОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ БИОТКАНЕЙ *in vivo*М. П. САМЦОВ¹⁾, Д. С. ТАРАСОВ¹⁾, А. С. ГОРЯЩЕНКО²⁾,
Н. И. КАЗАЧКИНА²⁾, В. В. ЖЕРДЕВА²⁾, А. П. САВИЦКИЙ²⁾, И. Г. МЕЕРОВИЧ²⁾¹⁾НИУ «Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко» БГУ,
ул. Курчатова, 7, 220108, г. Минск, Беларусь²⁾Институт биохимии им. А. Н. Баха Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
пр. Ленинский, 3, 119071, г. Москва, Россия

Приведены результаты исследований по установлению условий, обеспечивающих корректную регистрацию с помощью диффузионного флуоресцентного томографа концентрации фотосенсибилизатора на основе нового индотрикарбодиазиринного красителя в тканях *in vivo*. При концентрации красителя 4 мкмоль/л в 50 % сыворотке крови время жизни флуоресценции $\tau_f = 1,44$ нс, в 5 % бычьем сывороточном альбумине $\tau_f = 1,41$ нс, а кинетики затухания флуоресценции являются одноэкспоненциальными. Показано, что при концентрации красителя 40 мкмоль/л наряду с мономерами в растворе присутствуют нелюминесцирующие Н-агрегаты, полоса поглощения которых перекрывается со спектром флуоресценции мономеров. Вследствие этого становится возможным процесс безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения от мономеров на нелюминесцирующие ассоциаты, что приводит к уменьшению времени жизни флуоресценции молекул до 1,18 нс. Установлено, что в качестве среды, обеспечивающей создание раствора для фантома, оптимальным является использование сыворотки крови при концентрации красителя, не превышающей 4 мкмоль/л.

Ключевые слова: цианиновые красители; фотосенсибилизатор; флуоресцентная томография; время жизни флуоресценции; фантом.

Благодарность. Исследования выполнены при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф16Р-131), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-52-00206 Бел_а) и Министерства образования Республики Беларусь.

Образец цитирования:

Самцов М. П., Тарасов Д. С., Горященко А. С., Казачкина Н. И., Жердева В. В., Савицкий А. П., Меерович И. Г. Оптимизация параметров фантома для диффузионной флуоресцентной томографии биотканей *in vivo* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Физика. 2018. № 1. С. 33–40.

For citation:

Samtsov M. P., Tarasov D. S., Goryashchenko A. S., Kazachkina N. I., Zherdeva V. V., Savitsky A. P., Meerovich I. G. Optimization of the phantom parameters for diffuse optical fluorescence tomography of biotissues *in vivo*. *J. Belarus. State Univ. Phys.* 2018. No. 1. P. 33–40 (in Russ.).

Авторы:

Михаил Петрович Самцов – доктор физико-математических наук, доцент; заведующий лабораторией спектроскопии.

Дмитрий Сергеевич Тарасов – научный сотрудник лаборатории спектроскопии.

Александр Сергеевич Горященко – кандидат химических наук; научный сотрудник лаборатории физической биохимии.

Наталья Ивановна Казачкина – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории физической биохимии.

Виктория Вячеславовна Жердева – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории физической биохимии.

Александр Павлович Савицкий – доктор химических наук, профессор; заместитель директора, заведующий лабораторией физической биохимии.

Ирина Геннадьевна Меерович – кандидат химических наук; научный сотрудник лаборатории физической биохимии.

Authors:

Michael P. Samtsov, doctor of science (physics and mathematics), docent; head of the laboratory of spectroscopy.

samtsov@bsu.by

Dmitriy S. Tarasov, researcher at the laboratory of spectroscopy.

dmitrij-tarasov@list.ru

Alexander S. Goryashchenko, PhD (chemistry); researcher at the laboratory of physical biochemistry.

asgoryash@inbi.ras.ru

Natalia I. Kazachkina, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of physical biochemistry.

nkazachkina@inbi.ras.ru

Victoria V. Zherdeva, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of physical biochemistry.

vjerdeva@inbi.ras.ru

Alexander P. Savitsky, doctor of science (chemistry), full professor; deputy director, head of the laboratory of physical biochemistry.

apsavitsky@inbi.ras.ru

Irina G. Meerovich, PhD (chemistry); researcher at the laboratory of physical biochemistry.

irina_meer@mail.ru

OPTIMIZATION OF THE PHANTOM PARAMETERS FOR DIFFUSE OPTICAL FLUORESCENCE TOMOGRAPHY OF BIOTISSUES *in vivo*

M. P. SAMTSOV^a, D. S. TARASOV^a, A. S. GORYASHCHENKO^b,
N. I. KAZACHKINA^b, V. V. ZHERDEVA^b, A. P. SAVITSKY^b, I. G. MEEROVICH^b

^aA. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems, Belarusian State University,
7 Kurčatava Street, Minsk 220108, Belarus

^bA. N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center
«Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences,
3 Leninski Avenue, Moscow 119071, Russia

Corresponding author: D. S. Tarasov (dmitrij-tarasov@list.ru)

The paper presents the results obtained in studies of the conditions ensuring correct recording of the concentration of the photosensitizer based on a new indotricarbocyanine dye in biotissues *in vivo* with the use of a diffuse fluorescence tomograph. When the dye concentration in 50 % blood serum is 4 $\mu\text{mol/l}$, the fluorescence lifetime is $\tau_f = 1.44$ ns and in 5 % bovine serum albumin it comes to $\tau_f = 1.41$ ns, and the kinetics of fluorescence decay are single-exponential. It is demonstrated that, when a concentration of the dye is 40 $\mu\text{mol/l}$, in the solution one can observe not only monomers but also nonluminescent H-aggregates, with the absorption band overlapping the fluorescence spectrum of monomers. As a result, there is a possibility for nonradiative transfer of the electronic excitation energy from monomers to the nonluminescent associates leading to a decrease of the molecular fluorescence lifetime down to 1.18 ns. It has been found that an ideal medium to prepare a solution for the phantom is blood serum with the dye concentration below 4 $\mu\text{mol/l}$.

Key words: cyanine dyes; photosensitizer; fluorescence tomography; lifetime fluorescence; phantom.

Acknowledgements. The research was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project No. F16R-131), Russian Foundation for Fundamental Research (project No. 16-52-00206 Bel_a) and Ministry of Education of the Republic of Belarus.

Введение

Диффузионная флуоресцентная томография (ДФТ) является перспективным методом оптической диагностики распределения биозондов различного назначения в организме подопытных животных *in vivo*. Данный метод позволяет получать 3D-изображения органов лабораторных животных с учетом их индивидуальных особенностей [1]. Диффузионная флуоресцентная томография обеспечивает реконструирование распределения флуорофора в тканях в трехмерном виде путем получения ряда проекций объекта исследования [2]. Несомненный интерес представляет возможность регистрации по флуоресценции изменения концентрации фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии, исследования распределения фотосенсибилизатора (ФС) в органах и тканях *in vivo*. Кинетическая 3D-визуализация распределения трикарбоцианиновых инфракрасных ФС у мышей позволяет получать информацию для подбора оптимальных условий, повышающих эффективность проведения сеансов фотодинамической терапии. Цель настоящей работы – выяснение условий, обеспечивающих возможность корректной регистрации концентрации фотосенсибилизаторов в тканях *in vivo* с помощью диффузного флуоресцентного томографа.

Объекты и методика эксперимента

В качестве объекта исследования выбран разработанный в лаборатории спектроскопии НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко» БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель, полоса поглощения которого расположена в окне прозрачности биотканей, и он обладает высоким молярным коэффициентом поглощения в этой полосе [3]. Спектры флуоресценции красителя *in vivo* регистрировались с помощью спектрометра, созданного в НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко» БГУ [4], в котором подводы возбуждающего излучения к исследуемому объекту и флуоресценции в полихроматор осуществлялись с помощью оптического волокна. Для обеспечения усреднения регистрируемого сигнала по объему исследуемого образца диаметр пятна светового пучка возбуждающего излучения составлял около 4 мм. Спектры поглощения красителя в растворах зарегистрированы с помощью спектрофотометра PV1251 (Беларусь), спектры флуоресценции – спектрофлуориметра Fluorolog (США).

Кинетика затухания флуоресценции определялась методом время-коррелированного счета единичных фотонов на установке DCS-120 (*Becker & Hickel*, ФРГ) при использовании для возбуждения пикосекундного лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 650$ нм и фильтра с пропусканием от 750 нм для регистрации сигнала.

Эксперименты *in vivo* проводились на мышах BCF₁ (самки типа C57Bl/6JxCBA), а также на мышах Nu/Nu. Опухоль LLC (*Lewis lung cancer* – мышинная карцинома легких Льюиса) прививалась по 3 млн клеток на одну мышь подкожно в правую подлопаточную область.

Внутривенное введение фотосенсибилизатора животным осуществлялось в 5 % глюкозе в концентрации 5,0; 1,5; 1,0; 0,5 мг/кг. В работе использованы 5 % растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сыворотки крови (СК).

Исследования распределения красителя по тканям проводились с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000 (*Perkin Elmer*, США). В этом томографе обеспечивается возможность использования четырех каналов регистрации флуоресценции в спектральных областях с диапазонами длин волн 650–670, 690–740, 770–800 нм и более 805 нм при возбуждении излучением лазерных диодов с длиной волны 635; 670; 745 и 790 нм соответственно. Выделение регистрируемого спектрального диапазона излучения осуществляется светофильтрами, в качестве фотодетектора использована высокочувствительная охлаждаемая CCD-камера (США). Распределение флуоресцирующего зонда в исследуемом объекте, помещенном в томограф, отображается на мониторе с помощью цветовой шкалы. Значениям на цветовой шкале соответствует объемная молярная концентрация флуоресцентного зонда. Для новых флуорофоров перед сканированием биологических объектов предусмотрено проведение операции калибровки томографа путем регистрации флуоресценции раствора флуорофора с известной концентрацией, помещенного в фантом, который имеет идентичные исследуемым образцам геометрические параметры. В целях максимального приближения оптических свойств фантома к характеристикам исследуемых объектов в качестве материала, из которого он изготовлен, использована рассеивающая полимерная матрица. Для введения в фантом раствора флуорофора предусмотрен цилиндрический канал высотой 2 см и объемом 100 мкл.

Результаты эксперимента и их обсуждение

При проведении калибровки томографа необходимо выполнить регистрацию флуоресценции раствора красителя известной концентрации, помещенного в фантом, в выбранном спектральном канале. В последующем эти данные применяются для определения концентрации красителя в тканях подопытных животных путем сопоставления сигнала флуоресценции от тканей с величиной сигнала от фантома. С учетом этого обстоятельства для фантома необходимо использовать среду, в которой спектры поглощения и флуоресценции красителя совпадают с таковыми в биологических тканях. В целях установления спектральных характеристик красителя проведено исследование закономерностей флуоресценции красителя в тканях различных органов *ex vivo*.

Спектр флуоресценции исследуемого красителя в тканях органов подопытных животных, которым вводили внутривенно изотонический раствор красителя в концентрации до 1,5 мг/кг, расположен в диапазоне от 730 до 880 нм с максимумом на длине волны 758 нм (рис. 1). Форма и положение спектра красителя в тканях различных органов практически совпадают.

Примерно в этом же диапазоне лежит спектр флуоресценции красителя в БСА и СК (рис. 2).

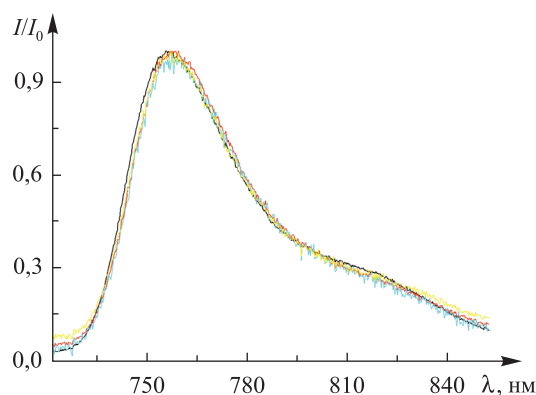


Рис. 1. Нормированные спектры флуоресценции I/I_0 исследуемого красителя в тканях органов подопытных животных *ex vivo* (печень, селезенка, опухоль LLC и мышца)

Fig. 1. Normalized fluorescence spectra I/I_0 of the investigated dye in the tissues of organs of experimental animals *ex vivo* (liver, spleen, LLC tumor and muscle)

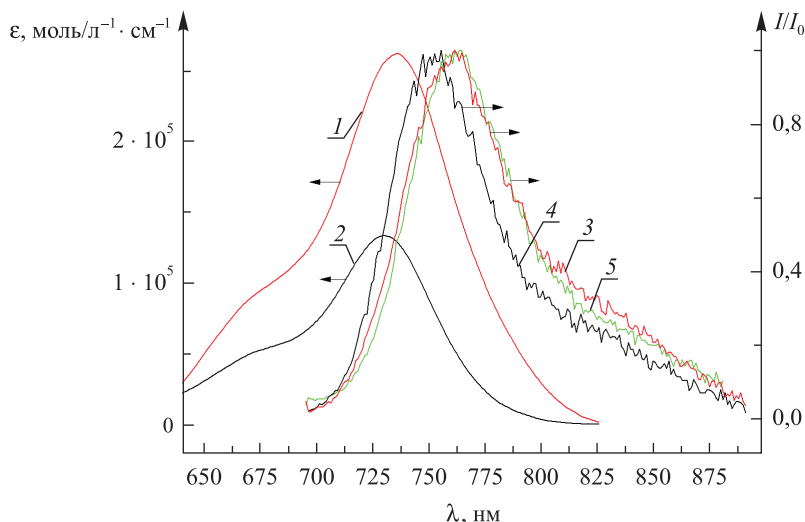


Рис. 2. Молярные коэффициенты поглощения ϵ красителя в СК (1), БСА (2). Нормированные спектры флуоресценции красителя в СК (3), БСА (4), опухолевых тканях (5)

Fig. 2. Molar extinction coefficients of the dye in blood serum (1), in BSA (2). The normalized fluorescence spectra of the dye in blood serum (3), in BSA (4) and in tumor tissues (5)

Фотофизические характеристики красителя в БСА и СК приведены в таблице. Спектральные характеристики красителя в этих средах имеют близкие значения, а квантовый выход и время жизни флуоресценции практически совпадают. Только молярный коэффициент поглощения красителя в СК имеет заметно более высокое значение.

Фотофизические свойства красителя в БСА и СК
Photophysical properties of the dye in serum albumin and blood serum

Растворитель	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, нм	$\lambda_{\text{f}}^{\text{max}}$, нм	$\Delta\lambda_{\text{abs}}^{1/2}$, нм	$\Delta\lambda_{\text{f}}^{1/2}$, нм	$\epsilon \cdot 10^5$, моль/л ⁻¹ · см ⁻¹	Φ_{f} (20 °C)	τ_{f} , нс	χ^2
БСА	730	752	61	53	1,3	0,18	1,4	1,33
СК	734	761	71	60	2,6	0,16	1,4	1,24

Примечание. Φ – Квантовый выход флуоресценции; χ^2 – среднеквадратичное отклонение разностей рассчитанной и наблюдаемой кинетик затухания флуоресценции.

Для каждой из использованных сред проведен отбор диапазона концентраций красителя в растворе для фантома, в котором наблюдается линейное соотношение между концентрацией флуорофора и интенсивностью его флуоресценции. Для этого регистрировалась флуоресценция раствора красителя известной концентрации в фантоме с его поверхности с помощью световолоконного спектрометра и томографа.

В результате измерений установлено, что при содержании красителя в сыворотке в диапазоне 0–4 мкмоль/л существует прямая пропорциональная зависимость между концентрацией красителя и величиной сигнала его флуоресценции. При более высоком содержании красителя наблюдается отклонение от линейности. В пределах указанного диапазона концентрации не наблюдается заметных изменений в положении и форме спектров флуоресценции красителя. Отклонение от прямой сопровождается смещением спектра флуоресценции в длинноволновую область и увеличением его полуширины (рис. 3).

Наряду с деформацией спектра флуоресценции при увеличении концентрации красителя в спектрах поглощения наблюдается рост интенсивности на коротковолновом краю, максимум поглощения смещается в коротковолновую область – с длины волны 734 нм на длину волны 731 нм, молярный коэффициент поглощения уменьшается. Такого рода изменения спектральных свойств с увеличением концентрации являются характерными для класса симметричных катионных полиметиновых красителей и обусловлены образованием Н-агрегатов молекул красителя [5–8]. Следует отметить, что форма спектра и коэффициент поглощения при разбавлении раствора красителя в диапазоне концентраций от 4,0 до 0,5 мкмоль/л остаются неизменными. Спектр возбуждения люминесценции при регистрации на длине волны 755 нм имеет единственный максимум (рис. 4, кривая 3), который практически совпадает с максимумом поглощения на волне длиной 734 нм, наблюдаемым при низких концентрациях красителя. При этом форма спектра возбуждения флуоресценции красителя не зависит от концентрации раствора. Положение и форма спектра флуоресценции не зависят от длины волны возбуждающего света. Это свидетельствует о том, что Н-агрегаты не обладают флуоресценцией, а также о том, что

в разбавленных растворах присутствуют только мономеры молекул, молярный коэффициент их поглощения не зависит от концентрации. С учетом постоянства значения молярного коэффициента поглощения мономеров красителя при изменении его концентрации проведены расчеты спектра поглощения ассоциатов красителя. Они выполнялись путем вычитания спектра мономеров из спектра поглощения раствора с высокой концентрацией красителя, в котором присутствуют и Н-агрегаты, и мономеры. В таком разностном спектре для ассоциатов проявляются две полосы, первая совпадает с коротковолновым плечом в спектре концентрированного раствора, а вторая лежит на длинноволновом краю полосы (рис. 4, кривая 10), что согласуется с данными работ [6; 7]. По мере увеличения концентрации раствора наблюдается рост поглощения ассоциатов в обеих полосах поглощения. Следует отметить, что положение полосы поглощения Н-агрегатов молекул красителя и в БСА, и в сыворотке крови находится в более длинноволновой области по сравнению с расположением полос поглощения ассоциатов в воде.

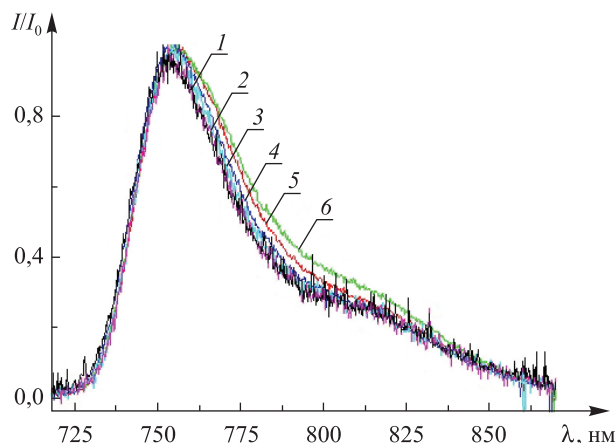


Рис. 3. Нормированные спектры флуоресценции исследуемого красителя в СК при концентрации 0,34 мкмоль/л (1); 0,69 мкмоль/л (2); 2,33 мкмоль/л (3); 4,1 мкмоль/л (4); 10,7 мкмоль/л (5); 21,3 мкмоль/л (6)

Fig. 3. Normalized fluorescence spectra of the dye in the blood serum at a concentration of 0.34 $\mu\text{mol/l}$ (1); 0.69 $\mu\text{mol/l}$ (2); 2.33 $\mu\text{mol/l}$ (3); 4.1 $\mu\text{mol/l}$ (4); 10.7 $\mu\text{mol/l}$ (5); 21.3 $\mu\text{mol/l}$ (6)

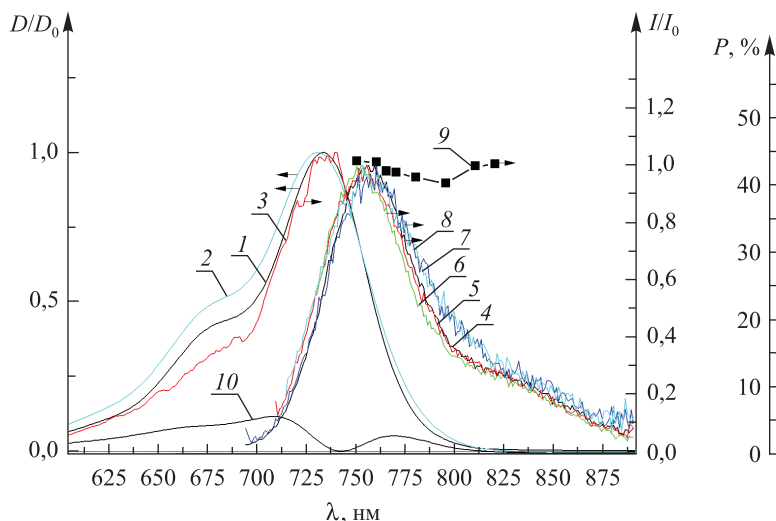


Рис. 4. Нормированные спектры поглощения D/D_0 (1, 2) и флуоресценции при возбуждении излучением с $\lambda = 682$ нм (4, 8), $\lambda = 700$ нм (5, 7), $\lambda = 720$ нм (6) красителя в СК при концентрации $C = 1,4 \cdot 10^{-6}$ моль/л (1, 4, 5, 6), $C = 1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л (7, 8); спектр возбуждения флуоресценции при регистрации на $\lambda = 755$ нм (3); поляризационный спектр P (9), разностный спектр поглощения (10)

Fig. 4. Normalized absorption (1, 2) and fluorescence spectra excited by radiation with $\lambda = 682$ nm (4, 8), $\lambda = 700$ nm (5, 7) and $\lambda = 720$ nm (6) dye in blood serum at a concentration of $C = 1.4 \cdot 10^{-6}$ mol/l (1, 4, 5, 6) and $C = 1.0 \cdot 10^{-5}$ mol/l (7, 8); the fluorescence excitation spectrum registered at $\lambda = 755$ nm (3); the polarization spectrum P (9) and the difference absorption spectrum (10)

Смещение в длинноволновую область максимумов поглощения молекул красителя и их ассоциатов при переходе от водного раствора к БСА и СК свидетельствует о том, что оба поглощающих центра расположены в среде с более низкой диэлектрической проницаемостью, т. е. находятся в органическом окружении. Степень поляризации флуоресценции молекул красителя в БСА и СК имеет значение 0,40–0,43 (рис. 4, кривая 9), что свидетельствует о высокой локальной вязкости окружения молекул красителя и образовании комплексов с биологическими макромолекулами.

В случае более высоких концентраций красителя $C = 1,03 \cdot 10^{-5}$ моль/л наблюдаются смещение спектра флуоресценции в длинноволновую область и увеличение его полуширины. Здесь спектры, как и при малой концентрации, не зависят от длины волны возбуждающего излучения. Обнаружено, что с увеличением концентрации красителя растет оптическая плотность в области перекрытия его спектров поглощения и флуоресценции, таким образом, наблюдаемые спектральные изменения обусловлены реабсорбцией.

Наряду с исследованием спектральных характеристик красителя проведены измерения времени жизни флуоресценции при изменении его концентрации в модельных биологических системах. В результате измерений при возбуждении излучением полупроводникового лазера с длиной волны, равной 650 нм, зарегистрированы одноэкспоненциальные кинетики затухания флуоресценции красителя. При концентрации красителя 4 мкмоль/л в 50 % СК время жизни флуоресценции τ_f составляло 1,44 нс, а в 5 % БСА – 1,41 нс. Увеличение концентрации красителя до 40 мкмоль/л приводит к тому, что время жизни флуоресценции красителя в сыворотке крови τ_f равно 1,18 нс и в 2 % БСА τ_f также составляет 1,18 нс. Наблюдаемое сокращение времени жизни флуоресценции при увеличении концентрации растворов свидетельствует об актуальности процесса динамического тушения флуоресценции красителя при высоких концентрациях. В случае концентрации красителя 40 мкмоль/л наряду с мономерами в растворе присутствуют нелюминесцирующие Н-агрегаты, полоса поглощения которых перекрывается со спектром флуоресценции мономеров (см. рис. 4, кривая 10). Вследствие такого перекрытия полос поглощения и флуоресценции становится возможным процесс безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения от мономеров на нелюминесцирующие ассоциаты, что и приводит к уменьшению времени жизни флуоресценции молекул. При этом известно [9], что вероятность переноса энергии пропорциональна силам осцилляторов переходов в доноре и акцепторе, интегралу перекрытия нормированного спектра излучения донора со спектром поглощения акцептора и обратно пропорциональна шестой степени расстояния между молекулами. В связи с этим можно сделать заключение о том, что молекулы красителя и их ассоциаты расположены на близком расстоянии.

В томографе определение концентрации флуорофора в тканях производится путем сравнения интенсивности сигнала его флуоресценции с сигналом от помещенного в фантом флуоресцирующего вещества с известной концентрацией, при этом используется условие линейного приближения, когда интенсивность сигнала флуоресценции прямо пропорциональна концентрации флуорофора:

$$I = A \cdot I_{\text{ex}} \cdot 2,3 \cdot \varphi_f \cdot c \cdot \varepsilon \cdot l,$$

где A – коэффициент пропорциональности, определяется геометрией возбуждения и регистрацией флуоресценции; I_{ex} – интенсивность возбуждающего излучения; φ_f – квантовый выход флуоресценции; c – концентрация красителя; ε – молярный десятичный коэффициент поглощения; l – толщина слоя тканей.

При проведении калибровки томографа определяется калибровочный коэффициент (Scale Factor, далее – SF), который связывает концентрацию красителя в фантоме и интенсивность флуоресценции. Величина SF определяется как отношение концентрации красителя (кр) в фантоме $C_{\text{кр}}$ к средней по объему фантома интенсивности I флуоресценции:

$$\text{SF} = \frac{C_{\text{кр}}}{I}.$$

Путем умножения этого параметра на зарегистрированную детектором томографа интенсивность флуоресценции красителя в тканях определяется концентрация флуорофора в тканях. В связи с этим для обеспечения корректной регистрации концентрации красителя с помощью томографа в тканях необходимо выполнить условие равенства квантового выхода его флуоресценции в растворе фантома и тканях (тк) органов животных. Измерение квантового выхода флуоресценции красителя в биологических тканях не представляется возможным, однако можно определить время затухания его флуоресценции. В случае одноэкспоненциальной кинетики квантовый выход флуоресценции пропорционален времени жизни:

$$\frac{\varphi}{\varphi_{\text{тк}}} = \frac{\tau_f}{\tau_{\text{тк}}},$$

где φ , τ_f и $\varphi_{\text{тк}}$, $\tau_{\text{тк}}$ – квантовый выход и время жизни флуоресценции красителя в растворе фантома и тканях соответственно.

В результате измерения с помощью конфокального сканера макрообъектов DCS-120 кинетики затухания флуоресценции красителя в опухолевых тканях подопытных животных *ex vivo* установлено, что она имеет одноэкспоненциальный характер, время жизни флуоресценции красителя составляет 1,5 нс при $\chi^2 = 1,3$.

Ближкие значения времени жизни флуоресценции красителя в опухолевых тканях и растворах для фантома в БСА и СК свидетельствуют о возможности корректного определения концентрации исследованного красителя с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000.

Скриншоты 3D-реконструкции флуоресцентных изображений распределения красителя флуоресценции по телу мыши Nu/Nu при использовании в первом случае фантома на основе раствора красителя в СК (а) и во втором – в БСА (б) через 45–50 мин после введения красителя приведены на рис. 5.

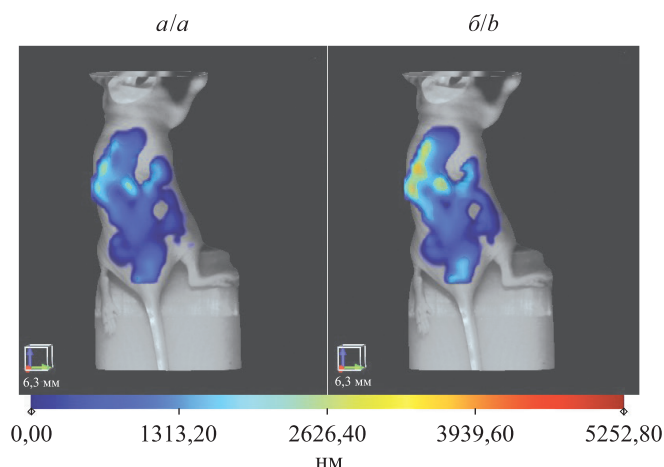


Рис. 5. 3D-реконструкции флуоресцентных изображений распределения красителя флуоресценции по телу мыши Nu/Nu при использовании в первом случае фантома на основе раствора красителя в СК (а) и во втором – в БСА (б)

Fig. 5. 3D reconstructed fluorescence images of the fluorescence dye distribution in the Nu/Nu mouse body using the phantom based on the dye solution in the blood serum (а) in the first case and in the second based on the BSA (б)

Объемная молярная концентрация красителя в исследуемом объекте отображается с помощью расположенной внизу рисунка цветовой шкалы. При использовании в качестве основы для фантома раствора красителя в СК значения концентраций красителя в тканях органов и SF-параметра примерно в два раза меньше по сравнению с данными, полученными при применении раствора красителя в БСА. Обусловлено это тем, что, как представлено в таблице и на рис. 2, молярный коэффициент поглощения красителя в СК (см. рис. 2, кривая 1) в два раза больше, чем в БСА (см. рис. 2, кривая 2). В связи с этим при одинаковом квантовом выходе флуоресценции красителя в этих средах интенсивность его флуоресценции в фантоме при использовании СК выше по сравнению с БСА, в результате чего SF-параметр для раствора в БСА выше.

В целях осуществления окончательного выбора среды для приготовления используемого в фантоме раствора проведена экстракция красителя бутанолом из тканей. В результате установлено, что значение концентрации красителя в тканях печени (2,5 мкмоль/л), найденное с помощью метода экстрагирования, практически совпало со значением, измеренным на томографе с фантомом на основе раствора красителя в СК (2,2 мкмоль/л). При использовании калибровки SF, полученной для фантома БСА, значение концентрации в печени (1,2 мкмоль/л) получилось в два раза меньше.

Заключение

При возбуждении излучением полупроводникового лазера с длиной волны, равной 650 нм, затухание флуоресценции красителя имеет одноэкспоненциальный характер, при концентрации красителя 4 мкмоль/л в 50 % СК время жизни флуоресценции τ_f равно 1,44 нс, а в 5 % БСА – 1,41 нс. Показано, что при увеличении концентрации красителя до 40 мкмоль/л наряду с мономерами в растворе присутствуют нелюминесцирующие Н-агрегаты, полоса поглощения которых перекрывается со спектром флуоресценции мономеров. Вследствие этого становится возможным процесс безызлучательно-го переноса энергии электронного возбуждения от мономеров на нелюминесцирующие ассоциаты,

что приводит к уменьшению времени жизни флуоресценции молекул до 1,18 нс. Определено, что в качестве среды раствора для фантома оптимальным является использование СК. Установлено, что для калибровки флуоресцентного томографа следует использовать раствор красителя в СК, концентрация которого не превышает 4 мкмоль/л.

Библиографические ссылки

1. Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging // *Annual Rev. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 8. P. 1–33. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095831.
2. Turchin I. V., Kamensky V. A., Plehanov V. I., et al. Fluorescence diffuse tomography for detection of red fluorescent protein expressed tumors in small animals // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 4. Article ID: 041310. DOI: 10.1117/1.2953528.
3. Lugovski A. A., Samtsov M. P., Kaplevsky K. N., et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2016. Vol. 316. P. 31–36. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.008.
4. Самцов М. П., Радько А. Е., Каплевский К. Н. и др. Лазерный спектрометрический комплекс для флуоресцентной диагностики области локализации опухолей // *Квантовая электроника : материалы V Междунар. науч.-техн. конф. (Минск, 22–25 нояб. 2004 г.)*. Минск, 2004. С. 20–24.
5. Тарасов Д. С., Каплевский К. Н., Самцов М. П. и др. Анализ спектральных свойств многокомпонентных растворов нового индотрикарбацианинового красителя // *Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика*. 2015. № 2. С. 8–12.
6. Egorov V. V. Optical line shapes for polymethine dyes and their aggregates: novel theory of quantum transitions and its correlation with experiment // *J. Lumin.* 2011. Vol. 131, issue 3. P. 543–547. DOI: 10.1016/j.jlumin.2010.09.001.
7. Egorov V. V. Nature of the narrow optical band in H⁺-aggregates: Dozy-chaos-exciton coupling // *AIP Adv.* 2014. Vol. 14, issue 7. P. 077111-1–077111-9. DOI: 10.1063/1.4889897.
8. Ищенко А. А. Строение и спектрально-люминесцентные свойства полиметиновых красителей. Киев : Наукова думка, 1994.
9. Ермолаев В. Л., Бодунов Е. И., Сवेशникова Е. Б. и др. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения. Л. : Наука, 1977.

References

1. Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging. *Annual Rev. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 8. P. 1–33. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095831.
2. Turchin I. V., Kamensky V. A., Plehanov V. I., et al. Fluorescence diffuse tomography for detection of red fluorescent protein expressed tumors in small animals. *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, No. 4. Article ID: 041310. DOI: 10.1117/1.2953528.
3. Lugovski A. A., Samtsov M. P., Kaplevsky K. N., et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2016. Vol. 316. P. 31–36. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.008.
4. Samtsov M. P., Rad'ko A. E., Kaplevsky K. N., et al. [Laser spectrometric complex for fluorescent diagnostics of tumor localization area]. *Kvantovaya elektronika : materialy V Mezhdunar. nauchn.-tekhn. konf. (Minsk, 22–25 Novemb., 2004)*. Minsk, 2004. P. 20–24 (in Russ.).
5. Tarasov D. S., Kaplevsky K. N., Samtsov M. P., et al. Analysis of spectral properties of multicomponent solutions of new indotricarbocyanine dye. *Vestnik BGU. Ser. 1, Fiz. Mat. Inform.* 2015. No. 2. P. 8–12 (in Russ.).
6. Egorov V. V. Optical line shapes for polymethine dyes and their aggregates: novel theory of quantum transitions and its correlation with experiment. *J. Lumin.* 2011. Vol. 131, issue 3. P. 543–547. DOI: 10.1016/j.jlumin.2010.09.001.
7. Egorov V. V. Nature of the narrow optical band in H⁺-aggregates: Dozy-chaos-exciton coupling. *AIP Adv.* 2014. Vol. 14, issue 7. P. 077111-1–077111-9. DOI: 10.1063/1.4889897.
8. Ishchenko A. A. [The structure and spectral luminescent properties of the polymethine dyes]. Kiev : Naukova dumka, 1994 (in Russ.).
9. Ermolaev V. L., Bodunov E. I., Sveshnikova E. B., et al. [Nonradiative electronic excitation energy transfer]. Leningrad : Nauka, 1977 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 06.11.2017.
Received by editorial board 06.11.2017.