

ЛАЗЕРНЫЙ ФЛУОРОМЕТР ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ *IN VIVO* ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

Сташевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М.

*Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
a.stasheuski@ifanbel.bas-net.by*

Активные формы кислорода, и в первую очередь синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), являются основными воздействующими факторами при фотодинамической терапии (ФДТ) рака. Фотоиндуцированное образование $^1\text{O}_2$ происходит посредством передачи энергии фотовозбуждения от молекулы-сенситизатора кислороду. Незначительная часть молекул $^1\text{O}_2$ претерпевает переход с испусканием квантов света в ближнем ИК-диапазоне (около 1270нм), тем самым, предоставляя возможность прямого детектирования синглетного кислорода по его люминесценции.

На эффективность сеанса фотодинамической терапии влияют три основных компонента, участвующих в образовании активного кислорода: концентрации лекарства и кислорода в тканях, а также интенсивность света. Разработаны методы так называемой непрямой дозиметрии для наблюдения за концентрацией лекарства в процессе ФДТ. Однако полный контроль за всеми тремя составляющими при проведении сеансов фототерапии представляет большие экспериментальные трудности и до настоящего времени не реализован. Метод дозиметрии синглетного кислорода позволяет следить только за концентрацией результирующего активного продукта фотосенсибилизирующей реакции, а не всех исходных компонентов. Метод прямой дозиметрии синглетного кислорода *in vivo* активно разрабатывается в последние годы, что послужило причиной создания нами высокочувствительного флуорометра, представленного в данной работе.

Квантовый выход люминесценции синглетного кислорода в воде равен $6,5 \cdot 10^{-7}$. Взаимодействие с биомолекулами приводит к ещё меньшей вероятности излучательной релаксации $^1\text{O}_2$ в клетках и тканях. Поэтому техника для исследования синглетного кислорода должна обладать высокой чувствительностью и хорошим временным разрешением.

В работе [1] описан флуорометр для ближнего ИК-диапазона. Это прибор, в первую очередь, для проведения исследований *in vitro*. Именно благодаря наработкам на данном приборе родилась идея, и стал возможным лазерный флуорометр для детектирования *in vivo* люминесценции синглетного кислорода [2]. Ключевыми элементами обеих установок яв-

ляются детектор Hamamatsu (H10330-45) и плата счёта электронных импульсов Fast (P7888-2). Детектирование люминесценции $^1\text{O}_2$ осуществляется в режиме счёта одиночных фотонов. Многоканальный временной счетчик регистрирует в каждом цикле возбуждения все пришедшие от ФЭУ импульсы, а не только первый, в отличие от классического метода времякоррелированного счёта одиночных фотонов. Это, безусловно, способствует получению надёжных сигналов за разумное время проведения эксперимента.

На рисунке 1 приведена упрощённая схема лазерного флуорометра для детектирования *in vivo* люминесценции синглетного кислорода. Для удобства использования и одновременно высокой эффективности сбора света в данном флуорометре применяется световод специальной конструкции. Центральное волокно в жгуте световода на одном из его концов выведено в отдельный рукав и служит для доставки возбуждающих лазерных импульсов. Остальные волокна, собранные во второй рукав, передают люминесценцию через полосовые интерференционные фильтры на фотокатод ФЭУ. Данные фильтры при минимальных потерях света обеспечивают эффективную селекцию на семи длинах волн из диапазона от 1050 до 1350 нм.

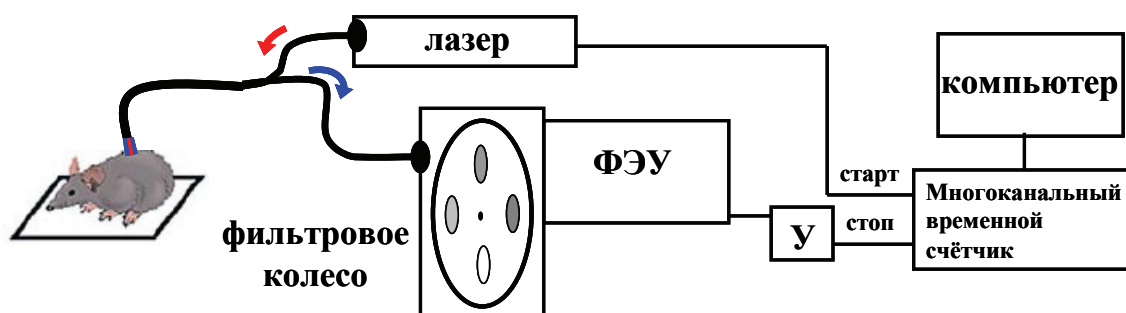


Рисунок 1 – Блок-схема лазерного флуорометра

Биологические ткани пропускают свет в области так называемого окна прозрачности: в интервале длин волн между 600нм и 800нм, где уже слабо поглощает оксигемоглобин и ещё мало поглощение воды. Поэтому в нашей установке для фотовозбуждения сенсibilизатора используется диодный лазер с длиной волны 667 нм. Питание лазера осуществляется прямоугольными импульсами тока с плавно регулируемой длительностью и частотой повторения. Крутизна фронтов нарастания и затухания оптического импульса не превышает 100 нс. Такие прямоугольные импульсы можно использовать для возбуждения образцов при измерениях кинетик затухания люминесценции синглетного кислорода, поскольку характерные времена жизни синглетного кислорода лежат в области от

единиц до сотен микросекунд.

На рисунке 2А приведены кинетики затухания ИК-люминесценции, полученные при возбуждении на 667нм суспензии противоопухолевого препарата «Фотолон» в молоке, которое было выбрано благодаря схожести параметров его рассеяния с оптическими характеристиками крови. Данный результат демонстрирует возможность успешно измерять на нашей установке сигналы люминесценции $^1\text{O}_2$ даже в сильно рассеивающих средах.

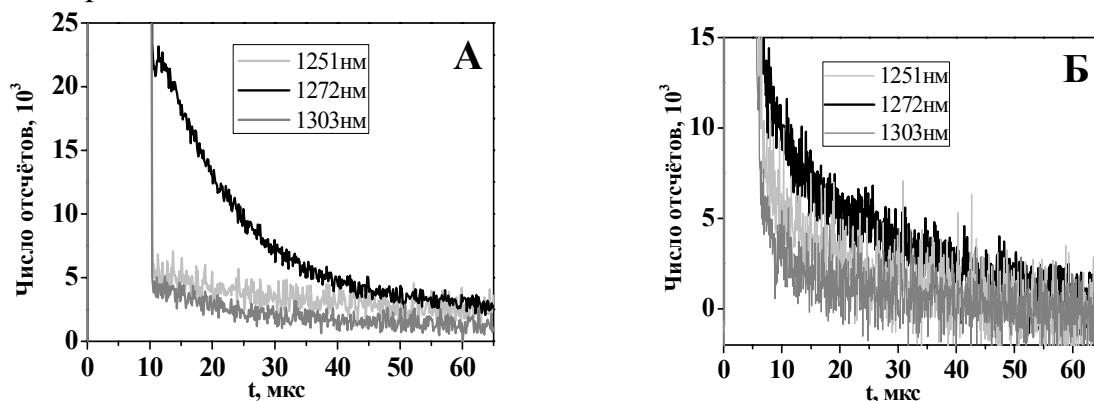


Рисунок 2 – Кинетики затухания сенсibilизированной «Фотолоном» люминесценции $^1\text{O}_2$ в молоке (А) и в печени крысы (Б)

После инъекции препарата «Фотолон» в хвостовую вену крысы обнаружена люминесценция вблизи 1270 нм из печени (рисунок 2Б). Основной вклад в регистрируемый сигнал вносит свечение синглетного кислорода.

Таким образом, созданный лазерный флуорометр позволяет проводить исследования люминесценции синглетного кислорода и в растворах, и в суспензиях и в биологических тканях.

Авторы выражают благодарности Т.В. Трухачёвой (РУП Белмед-препараты) за любезно предоставленный для исследований препарат «Фотолон»; коллегам М.В. Пархоц и Е.С. Жарниковой за помощь при проведении ряда экспериментов; РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова за подготовку экспериментальных животных.

Литература

1. Галиевский В.А., Сташевский А.С., Киселев В.В., Шабусов А.И., Бельков М.В., Джагаров Б.М. Лазерный флуорометр с наносекундным разрешением для ближнего и.к.-диапазона // Приборы и техника эксперимента – 2010. – № 4 – С. 109–116.

2. Сташевский А.С., Галиевский В.А., Джагаров Б.М. Высокочувствительные лазерные флуорометры для ближнего инфракрасного и видимого диапазонов // Приборы и методы измерений – 2011. – № 1(2) – С.25–31.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ МЕТОДОМ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ НПВО: КРИОГЕЛИ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

Третинников О.Н., Сушко Н.И., Загорская С.А.

*Институт физики им. Б.И.Степанова НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, o.tretinnikov@ifanbel.bas-net.by*

Полимерные гидрогели имеют важные практические применения в медицине и биологии [1]. Макроскопические свойства этих материалов во многом определяются микроструктурой их полимерной матрицы. Поэтому структурные исследования гидрогелей важны для понимания и прогнозирования их свойств. Одним из наиболее чувствительных и информативных методов анализа структуры полимеров является ИК-Фурье-спектроскопия. Однако ее возможности, применительно к водным системам, существенно ограничены сильным поглощением ИК излучения водой. Метод нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) решает эту проблему, что открывает новые возможности изучения структуры гидрогелей и механизмов гелеобразования [2].

Криогели поливинилового спирта (ПВС) представляют собой гидрогели, образующиеся в результате замораживания и оттаивания водных растворов ПВС. Они имеют высокую механическую прочность и эластичность, нетоксичны, биосовместимы и биоразлагаемы. Поэтому криогели ПВС все больше применяются в качестве сред для иммобилизации и культивирования клеток, матриц для контролируемой доставки и высвобождения лекарств, создания искусственных биологических тканей.

Криогели ПВС – физические гели, т.е. в них узлы полимерной сетки образованы за счет невалентных взаимодействий. Природа узлов сетки до конца не понята. Одни считают, что узлами являются кристаллиты ПВС, другие, что узлы образованы кластерами цепей ПВС, связанных водородными связями. Причина в том, что широкоуголовая рентгеновская дифракция – единственный прямой метод анализа кристалличности полимеров – имеет недостаточную чувствительность по отношению к гид-