

Л.С. ЛЯШЕНКО

ВЛИЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ *in vivo*

It has been demonstrated the influence of different forms of hemoglobin in the position and shape of the fluorescence spectrum of the dye in the tissue *in vivo*. The comparison of the experimental data and numerical simulation results has revealed that deformation of the dye fluorescence spectrum upon photochemotherapy is due to an increased percentage of methemoglobin in the total hemoglobin concentration of a tumor tissue.

Наличие у полиметиновых красителей (ПК) полосы поглощения в области наибольшей прозрачности биологических тканей обуславливает перспективность применения этих соединений в качестве фотосенсибилизаторов для фототерапии новообразований [1]. В спектральной области флуоресценции полиметинового красителя (700÷900 нм) наиболее интенсивно поглощают такие эндогенные биомолекулы, как гемоглобин, меланин и вода [2]. В связи с этим не исключено влияние данных компонентов крови на флуоресценцию ПК, локализованных в тканях *in vivo*. В наиболее значительной мере в полосе флуоресценции ПК изменяется поглощение различных форм гемоглобина: окси-, дезокси- и метгемоглобина. Ввиду этого изменение соотношения концентраций этих форм может оказывать влияние на форму и положение спектра, прошедшего через ткани, флуоресценции красителя [3].

Целью данной работы является анализ влияния различных форм гемоглобина крови на положение и форму спектра флуоресценции красителя в тканях *in vivo* и изучение спектрально-люминесцентных

свойств полиметинового красителя в живом организме непосредственно после введения фотосенсибилизатора, а также в процессе сеанса фотохимиотерапии и после его завершения.

В качестве объекта исследований использован симметричный трикарбоцианиновый краситель, который разработан и синтезирован в лаборатории спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко [4]. Эксперименты *in vivo* проводились на беспородных белых крысах с переносимыми в области бедра опухолями следующих штаммов: саркома 45 (S-45), саркома M1 (SM-1), карциносаркома Уокера (W-256). Для исследований использованы группы из 6÷8 животных. Препарат вводили внутривенно в соотношении 1÷5 мг/кг. Исследования спектральных свойств красителя *in vitro* проводились на культуре опухолевых клеток HeLa. Фотовоздействие производилось излучением полупроводникового лазера с длиной волны $\lambda=740$ нм, площадь участка облучаемой опухоли составляла около 1 см^2 .

Результаты и их обсуждение

Для оценки влияния поглощения гемоглобина на спектр флуоресценции красителя представляется важным сравнение спектров флуоресценции ПК в средах с разной концентрацией гемоглобина. С помощью разработанного компактного спектрометрического комплекса [5] зарегистрированы спектры флуоресценции фотосенсибилизатора в суспензии клеток HeLa, где гемоглобин отсутствует, в освобожденных от крови образцах ткани животного, где гемоглобин находится в значительно меньшей концентрации, и тканях *in vivo* в организме подопытных животных (рис. 1). Также было проведено сравнение спектральных свойств ПК в этих средах для определения природы окружения молекул красителя в опухолевой ткани животного *in vivo*. Совпадение максимумов полос поглощения в образце ткани печени животного и в культуре раковых клеток HeLa свидетельствует о близком по полярности окружении молекул красителя в этих системах. Спектры флуоресценции ПК в освобожденных от крови образцах ткани животного совпадают по положению максимума с его спектрами в культуре опухолевых клеток HeLa. Вместе с тем спектр флуоресценции красителя в опухолевых тканях *in vivo* имеет меньшую полуширину, чем в клетках HeLa и в освобожденных от крови образцах ткани. Различие в полуширине спектров флуоресценции можно интерпретировать в рамках предположения о влиянии поглощения различных форм гемоглобина на спектр флуоресценции красителя.

Регистрация спектров флуоресценции красителя *in vivo* осуществлялась непосредственно через кожу и проводилась с помощью спектрометрического комплекса, источником возбуждения в котором служит полупроводниковый лазер с $\lambda=683$ нм и мощностью около 20 мВт. Свет такого спектрального состава и мощности проникает через кожный покров в ткань на глубину примерно 1,5 см [6]. Для расчета влияния поглощения компонент биологических тканей на форму регистрируемого спектра флуоресценции использована теоретическая модель, позволяющая учесть эффект фильтра, обусловленного поглощением крови. Рассеяние биотканей в данной модели не учитывали, поскольку коэффициент рассеяния в спектральном диапазоне, соответствующем полосе флуоресценции исследованного красителя, изменяется незначительно и не может оказывать существенного влияния на положение и форму спектра флуоресценции ПК [7].

В общем случае выражение для спектра флуоресценции ПК *in vivo*, обусловленного испусканием молекул красителя с глубины биоткани до $l = 1,5$ см, с учетом поглощения различных форм гемоглобина и в соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бэра можно записать следующим образом:

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \int_0^{1,5} 10^{-(C_{\text{HbO}_2} \varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda) + C_{\text{Hb}} \varepsilon_{\text{Hb}}(\lambda) + C_{\text{MetHb}} \varepsilon_{\text{MetHb}}(\lambda))} dl, \quad (1)$$

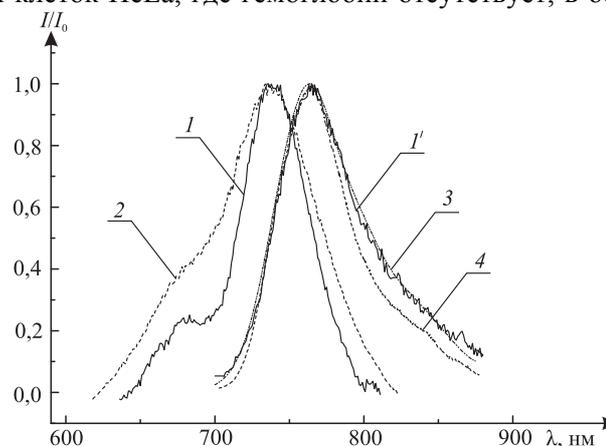


Рис. 1. Спектр поглощения и флуоресценции красителя в культуре раковых клеток HeLa (1 и 1'); спектр поглощения ПК в освобожденном от крови образце ткани печени (2); спектры флуоресценции красителя в освобожденной от крови опухолевой ткани S-45 (3) и ПК в опухолевом узле S-45 *in vivo* (4)

где $I_0(\lambda)$ – спектр флуоресценции молекул красителя, испущенный с глубины l от поверхности биотканей; C_{HbO_2} , C_{Hb} , C_{MetHb} – концентрации оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и метгемоглобина соответственно; $\varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{Hb}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{MetHb}}(\lambda)$ – молярные коэффициенты поглощения оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и метгемоглобина, значения которых взяты из литературы [2, 8]. В качестве спектра флуоресценции полиметинового красителя $I_0(\lambda)$ на глубине l использован спектр флуоресценции ПК, зарегистрированный в освобожденных от крови образцах опухолевой ткани.

Путем вариации процентного соотношения содержания оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и метгемоглобина проведен численный расчет спектра флуоресценции красителя *in vivo* с учетом поглощения компонент крови. В качестве критерия правильности подбора концентраций использовано условие минимального квадратичного отклонения расчетного спектра от регистрируемого реально *in vivo*. При этом параметры C_{MetHb} , C_{Hb} , C_{HbO_2} , характеризующие концентрацию различных форм гемоглобина, определялись путем минимизации функции $\xi(C_{\text{MetHb}}, C_{\text{Hb}}, C_{\text{HbO}_2})$ по методу координатного спуска [9]:

$$\xi(C_{\text{HbO}_2}, C_{\text{Hb}}, C_{\text{MetHb}}) = \sum_{\lambda} (I(\lambda) - I_{\text{эксп}}(\lambda))^2. \quad (2)$$

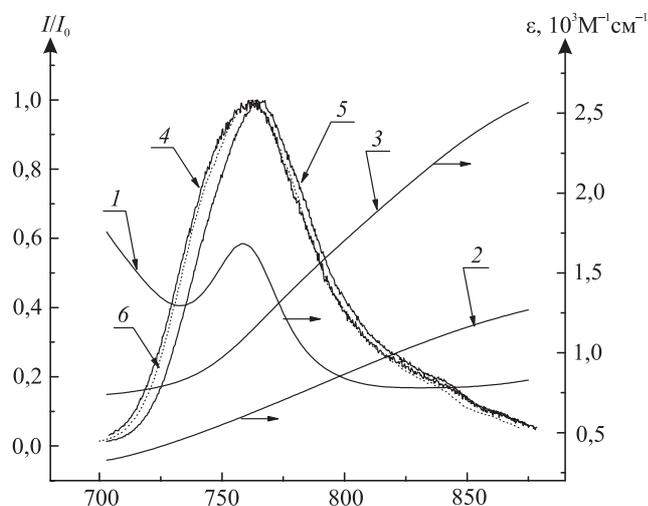


Рис. 2. Спектры поглощения дезоксигемоглобина (1), оксигемоглобина (2) и метгемоглобина (3); спектры флуоресценции ПК в опухолевом узле S-45 *in vivo* (4), в культуре раковых клеток HeLa (5); спектр флуоресценции, рассчитанный с учетом влияния поглощения оксигемоглобина (HbO₂) и дезоксигемоглобина (Hb) (6)

Значение функции $\xi(C_{\text{MetHb}}, C_{\text{Hb}}, C_{\text{HbO}_2})$ определялось по формуле (2), которая представляет собой квадрат разности экспериментально полученного спектра флуоресценции ПК *in vivo* и спектра, рассчитанного по формуле (1).

Оптимальное совпадение рассчитанного и экспериментального спектров получено при концентрации оксигемоглобина более 85 % и концентрации дезоксигемоглобина около 14 % от общей концентрации гемоглобина, концентрация метгемоглобина не превышала 1 % (рис. 2). Такое соотношение окси-, дезокси- и метгемоглобина согласуется с литературными данными о возможных концентрациях различных форм гемоглобина в тканях *in vivo* [10]. На основании этих данных сделано заключение, что поглощение эндогенных биомолекул обуславливает уменьшение полуширины спектра флуоресценции красителя *in vivo* по сравнению со спектром в культуре раковых клеток HeLa и в освобожденных от

крови образцах опухолевой ткани. Полученные спектральные данные позволяют заключить, что *in vivo* молекулы красителя локализованы в области с низкой диэлектрической проницаемостью среды, так же как и в условиях *in vitro*.

В процессе сеанса фотохимиотерапии в опухолевой ткани изменяется соотношение концентраций различных форм гемоглобина – уменьшается доля оксигемоглобина [11]. Вследствие изменения соотношения различных форм гемоглобина после завершения сеанса фотохимиотерапии выражение для регистрируемого спектра флуоресценции ПК на основании (1) можно записать следующим образом:

$$I'(\lambda) = I_0(\lambda) \int_0^{1,5} 10^{l(C'_{\text{HbO}_2} \varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda) + C'_{\text{Hb}} \varepsilon_{\text{Hb}}(\lambda) + C'_{\text{MetHb}} \varepsilon_{\text{MetHb}}(\lambda))} dl, \quad (3)$$

где $I'(\lambda)$ – рассчитанный спектр флуоресценции ПК *in vivo*; $C'x$ – концентрации различных форм гемоглобина после фотовоздействия.

Проведены исследования спектрально-люминесцентных свойств полиметинового красителя в тканях *in vivo* в процессе проведения сеанса фотохимиотерапии и в течение двух часов после окончания. Оказалось, что по окончании фотовоздействия в облучаемом участке опухоли регистрируется падение интенсивности флуоресценции, увеличение полуширины спектра красителя и коротковолновое смещение максимума (рис. 3).

Наблюдаемые изменения в спектрах флуоресценции красителя в процессе фотооблучения могут быть обусловлены различиями оптических свойств биологической среды либо спектрально-люминесцентных свойств красителя. Однако описанные изменения флуоресценции красителя в результате светового воздействия проявляются только в тканях *in vivo* и данные о величине деформации спектра флуоресценции в облученном участке опухоли после фотохимиотерапии коррелируют с эффективностью повреждения опухолевой ткани. Следовательно, наблюдаемые в процессе фотовоздействия спектральные деформации связаны с оптическими свойствами биологической среды.

Оптимальное совпадение экспериментального и теоретического спектра флуоресценции красителя в облученном участке опухоли *in vivo* наблюдается при значительном повышении концентрации метгемоглобина в опухолевой ткани в результате фотовоздействия. На основании результатов, полученных численным методом, деформация спектра после фотовоздействия в облученной части опухоли обусловлена повышением концентрации метгемоглобина до 50 % от общей концентрации гемоглобина в крови, остальные 50 % приходятся на оксигемоглобин (около 30 %) и дезоксигемоглобин (около 20 %).

* * *

Таким образом, поглощение эндогенных биомолекул обуславливает уменьшение полуширины спектра флуоресценции красителя *in vivo* по сравнению со спектром в культуре раковых клеток HeLa и в освобожденных от крови образцах опухолевой ткани. Установлено, что в живом организме молекулы красителя локализованы в области с низкой диэлектрической проницаемостью среды. Показано, что изменение соотношения различных форм гемоглобина (увеличение доли метгемоглобина) в крови является основной причиной деформации спектра флуоресценции в процессе сеанса фотохимиотерапии.

1. Самцов М. П., Воропай Е. С., Каплевский К. Н. и др. // ЖПС. 2009. Т. 76. № 4. С. 547.
2. Matcher S., Elwell C., Cooper C. et al. // *Analyt. Biochem.* 1995. Vol. 227. № 1. P. 54.
3. Zijlstra W., Buursma A., Assendelft van O. // *Clinical Chemistry.* 1981. Vol. 27. P. 1903.
4. Воропай Е. С., Самцов М. П., Каплевский К. Н. // *Журн. прикл. спектр.* 2004. Т. 71. № 2. С. 166.
5. Воропай Е. С., Самцов М. П., Гулис И. М. и др. *Спектральные приборы для аналитических применений. Перспективные разработки / Под ред. Е. С. Воропая. Мн., 2005.*
6. Воропай Е. С., Самцов М. П., Чалов В. Н., Жаврид Э. А. // ЖПС. 2001. Т. 68. № 3. С. 359.
7. Taroni P., Pifferi A., Torricelli A. et al. // *Photochem. Photobiol.* 2003. № 2. P. 124.
8. Abdallah O., Stork W., Miller-Glaser K., Bolz A. // *Biomedizinische Technik.* 2003. № 48.
9. Мудров А. Е. *Численные методы для ПЭВМ на языках бейсик, фортран и паскаль.* Томск, 1991.
10. Куценко С. А. *Основы токсикологии.* СПб., 2002.
11. Seto Y., Kataoka M., Tsuge K. // *Forensic Sci Int.* 2001. Vol. 121. № 1. P. 144.

Поступила в редакцию 13.12.10.

Людмила Сергеевна Ляшенко – аспирант кафедры лазерной физики и спектроскопии. Научный руководитель – доктор физико-математических наук, доцент М. П. Самцов.

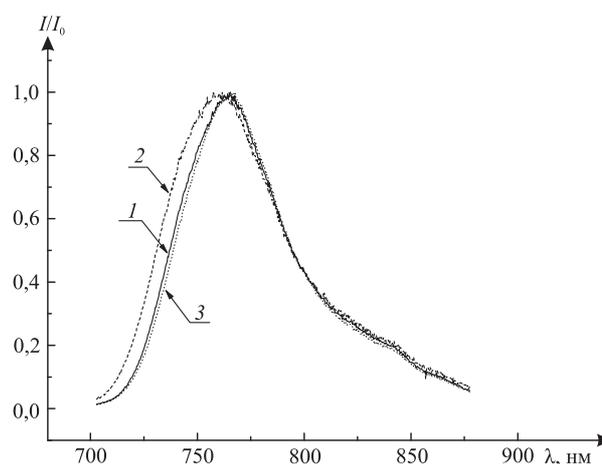


Рис. 3. Спектры флуоресценции ПК *in vivo* в опухоли крысы до облучения (1), после фотовоздействия с плотностью мощности 200 мВт/см² и энергетической экспозиционной дозой 280 Дж/см² (2), в необлученной части опухоли (3)