

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ФАНТОМА ДЛЯ ДИФФУЗИОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ БИОТКАНЕЙ *IN VIVO*

¹Научно-исследовательское учреждение «Институт прикладных физических проблем имени А.Н.Севченко» Белорусского государственного университета.

Минск, Республика Беларусь. samtsov@bsu.by

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Показано, что в качестве среды при создании фантома для диффузионной флуоресцентной томографии биотканей *in vivo* оптимальным является использование сыворотки крови. Установлено, что для калибровки флуоресцентного томографа следует использовать раствор красителя в сыворотке крови мышей (с содержанием воды менее 50 %) при концентрации красителя не превышающей 51000 нМ.

Диффузионная флуоресцентная томография (ДФТ) является перспективным методом оптической диагностики распределения биозондов различного назначения в организме подопытных животных *in vivo*. Она позволяет получать 3D изображения органов лабораторных животных с учетом их индивидуальных особенностей [1]. Несомненный интерес представляет возможность регистрировать по флуоресценции динамику накопления фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии, неинвазивно исследовать фармакокинетику и распределение фотосенсибилизатора (ФС) в органах и тканях *in vivo*. Диффузионная флуоресцентная томография позволяет реконструировать распределение флуорофора в тканях в трёхмерном виде путем получения ряда проекций объекта исследования [2]. Кинетическая 3D-визуализация распределения трикарбоцианиновых инфракрасных ФС у мышей позволяет подобрать оптимальные условия по проведению сеансов фотодинамической терапии.

В качестве объектов исследования выбран разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель, полоса поглощения которого расположена в окне прозрачности биотканей и обладает высоким молярным коэффициентом экстинкции в этой полосе [3]. Спектры флуоресценции красителя *in vivo* регистрировались с помощью спектрометра, разработанного в НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ, в котором подвод возбуждающего излучения к исследуемому объекту и флуоресценции в полихроматор осуществлялись с помощью оптического волокна. Для обеспечения усреднения регистрируемого сигнала по объему исследуемого образца сечение светового пучка возбуждающего излучения на поверхности образца составляло пятно диаметром около 5 мм. Фармакокинетика и распределение красителя по органам определялись с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000 (Perkin Elmer, США). Указанный томограф главным образом предназначен для визуализации распределения ряда коммерческих флуоресцентных зондов. В связи с этим предустановленные каналы возбуждения и регистрации флуоресценции в томографе определяются спектрально-люминесцентными характеристиками коммерческих зондов. В томографе FMT 4000 предустановлены четыре канала регистрации информации. В качестве источников возбуждения используются лазерные диоды с длиной волны излучения 635 нм, 670 нм, 745 нм и 790 нм. Система регистрации флуоресценции состоит из высокочувствительной CCD-камеры с набором полосовых фильтров для каждого из каналов (650-670 нм, 690-740 нм, 770-800 нм, 805+ нм). Длина волны возбуждающего излучения и соответствующие полосы регистрации на томографе жестко привязаны. В стандартном функционале томографа включена возможность применения иных флуорофоров.

Для регистрации испускания флуорофора в тканях и фантоме необходимо обеспечить возбуждение флуоресценции одним источником света и детектировать ее CCD матрицей то-

мографа при использовании светофильтров с определенной полосой пропускания. Поэтому для заправки фантома следует использовать среду, в которой спектры поглощения и флуоресценции красителя совпадают с таковыми в биологических тканях. Учитывая это обстоятельство, в качестве среды для создания фантома использована сыворотка крови мышей, в которой спектры флуоресценции исследованного красителя в опухолевых тканях и сыворотке практически совпадают. Сыворотка крови представляет собой сложную коллоидную систему, усредненный состав которой выглядит следующим образом: 90% вода и 10% растворенные вещества, 70% из которых составляют белки, 10% – неорганические соли и около 20% – низкомолекулярные органические соединения [4]. В водной среде исследуемый краситель склонен к агрегации, максимум поглощения находится на 709 нм, а максимум флуоресценции – 736 нм. Квантовый выход флуоресценции красителя в воде достаточно мал – 3%. Для установления возможности использования мышинной сыворотки крови в качестве среды для фантома проведены исследования спектрально-люминесцентных свойств ПК в сыворотке при увеличении доли воды при неизменной концентрации ПК в растворе. Последовательным добавлением водного раствора ПК к сывороточному осуществлялось уменьшение концентрации биологических компонентов сыворотки. При уменьшении концентрации биологических компонентов сыворотки наблюдается уменьшение поглощения в длинноволновом максимуме на 731 нм, деформация формы спектра со смещением максимума на 706 нм.

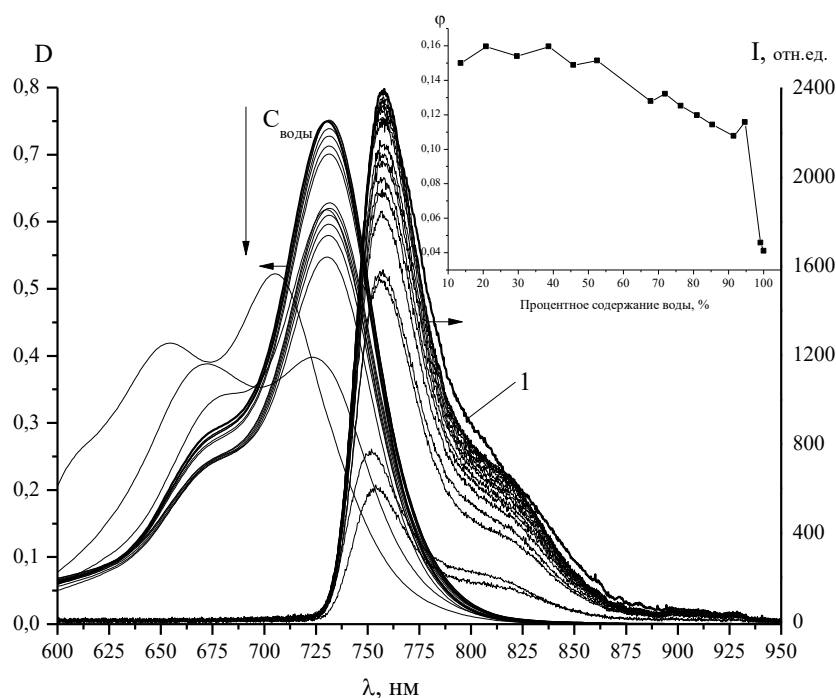


Рисунок 1 – Спектры поглощения и флуоресценции красителя в сыворотке крови мыши при изменении доли воды с 5 % до 100 % и постоянной концентрации красителя 4,4 М, спектр флуоресценции красителя в опухолевых тканях. На вставке квантовый выход флуоресценции красителя в зависимости от процентного содержания воды.

При этом в спектрах флуоресценции наблюдается смещение максимума с 758 нм на 751 нм (рисунок 1). Квантовый выход флуоресценции красителя в сыворотке крови зависит от концентрации воды. При этом, в достаточно широком диапазоне изменения доли воды в сыворотке крови (от 0 до 50 %) квантовый выход имеет постоянно значение $\phi_f = 0,15$, а в воде составляет 0,03. В диапазоне от 0 до 50 % содержания воды не изменяется положение и форма спектров поглощения и флуоресценции. На основании полученных данных сделано заключение, что в качестве основы раствора для фантома можно использовать ПК в мышинной сыворотке крови при содержании до 50 % воды. В томографе определение концентрации флуорофора в тканях производится путем сравнения интенсивности сигнала его флуорес-

ценции 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. При малых концентрациях, когда оптическая плотность флуорофора в тканях менее 0,1 сигнал флуоресценции равен: $I = A \cdot I_{ex} \cdot 2,3 \cdot \varphi_f \cdot c \cdot \varepsilon \cdot l$, где A - коэффициент, I_{ex} – интенсивность возбуждающего излучения, φ_f квантовый выход флуоресценции, c – концентрация, ε - молярный десятичный коэффициент поглощения, l – толщина слоя тканей.

Для используемого в фантоме раствора определен диапазон концентраций красителя, в котором сохраняется линейная зависимость между интенсивностью сигнала флуоресценции и его содержанием. Для этого раствор красителя в сыворотке помещался в фантом, а флуоресценция регистрировалась с поверхности фантома с помощью световолоконного спектрометра. Установлено, что при содержании красителя в сыворотке более чем 51000 нМ наблюдается отклонение от прямой пропорциональной зависимости сигнала его флуоресценции от концентрации. При концентрации соответствующей линейному участку зависимости не наблюдалось изменений в положении и форме спектров флуоресценции красителя. За пределами этого участка сопровождается смещением спектра флуоресценции в длинноволновую область и увеличение полуширины спектра. Наблюдаемые изменения обусловлены перепоглощением света флуоресценции при увеличении концентрации красителя.

На основании измерения времени жизни флуоресценции красителя в крови подопытных животных и в сыворотке крови установлено, что затухание флуоресценции красителя в крови лабораторных животных имеет одноэкспоненциальный характер, составляет $\tau = 2,27 \pm 0,07$ нс и совпадает со значением времени жизни в сыворотке крови. При этом значение τ не изменяется при заборе образцов крови до 48 часов после введения ФС, что при одноэкспоненциальном характере затухания флуоресценции красителя свидетельствует о равенстве квантового выхода его флуоресценции в тканях и в фантоме, а также о постоянстве значения этого параметра во время эксперимента. Таким образом, выявлено, что в качестве среды для создания раствора для фантома оптимальным является использование сыворотки крови, в которой спектры флуоресценции исследованного красителя совпадают со спектрами в биотканях. Установлено, что для калибровки флуоресцентного томографа следует использовать раствор красителя в сыворотке крови мышей (с содержанием воды менее 50 %) при концентрации красителя не превышающей 51000 нМ.

Список литературы

1. Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging // *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, № 8, P. 1-33
2. Turchin I.V., Kamensky V.A., Plehanov V.I. Fluorescence diffuse tomography for detection of red fluorescent protein expressed tumors in small animals // *J Biomed Opt*, 2008, V. 13, № 4, P. 041310.
3. Alexander Lugovski, Michael Samtsov, Kirill Kaplevsky, Petr Petrov, Eugene Voropay, Dmitri Tarasau. Yuri P. Istomin Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics//*Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 2016.V.316, P.31-36.
4. Ю.Ю. Тарасевич, А.К. Аюпова Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации // *Журнал технической физики*, 2003, том 73, вып. 5.