

РЕГИСТРАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗОНДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В ТКАНЯХ *in vivo*

Е. С. ВОРОПАЙ¹⁾, М. П. САМЦОВ²⁾, Л. С. ЛЯШЕНКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾НИИУ «Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко» БГУ,
ул. Курчатова, 7, 220108, г. Минск, Республика Беларусь

Отмечено, что высокий уровень рассеяния света и собственная люминесценция биологических тканей *in vivo* создают помехи для корректной регистрации флуоресцентных зондов в таких системах. Осуществлена оптимизация условий регистрации флуоресценции полиметиновых красителей в тканях *in vivo*. Установлено, что для уменьшения влияния собственного свечения биотканей при регистрации флуоресценции в спектральном диапазоне 710–900 нм *in vivo* следует использовать для возбуждения излучение лазерных источников с длиной волны более 676 нм. Показано, что для подавления в спектрометре на три порядка уровня рассеянного света от возбуждающего лазера с длиной волны λ , равной 682 нм, оптимальным является использование абсорбционного светофильтра марки СЗС-20, который не люминесцирует в исследованном спектральном диапазоне. Путем сканирования световодом поверхности опухолевого узла определено, что при наличии некроза тканей сигнал флуоресценции полиметинового красителя в этой области в 3–5 раз меньше по сравнению с остальными частями опухоли.

Ключевые слова: полиметиновые красители; регистрация флуоресценции; *in vivo*; фотоактивность.

RECORDING OF FLUORESCENCE FROM THE PROBES BASED ON POLYMETHINE DYES IN THE TISSUES *in vivo*

E. S. VOROPAY^a, M. P. SAMTSOV^b, L. S. LYASHENKO^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bA. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University,
Kurchatova street, 7, 220108, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: lyashenko@bsu.by

A high level of light scattering and intrinsic luminescence of biological tissues *in vivo* interfere with correct recording of signals from fluorescent probes in such systems. This work presents the optimized conditions for recording of polymethine dye fluorescence in the tissues *in vivo*. It has been found that, to lower the effect of intrinsic luminescence

Образец цитирования:

Воропай Е. С., Самцов М. П., Ляшенко Л. С. Регистрация флуоресценции зондов на основе полиметиновых красителей в тканях *in vivo* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Физика. 2017. № 1. С. 28–33.

For citation:

Voropay E. S., Samtsov M. P., Lyashenko L. S. Recording of fluorescence from the probes based on polymethine dyes in the tissues *in vivo*. *J. Belarus. State Univ. Phys.* 2017. No. 1. P. 28–33 (in Russ.).

Авторы:

Евгений Семенович Воропай – доктор физико-математических наук, профессор; заведующий кафедрой лазерной физики и спектроскопии физического факультета.
Михаил Петрович Самцов – доктор физико-математических наук; заведующий лабораторией спектроскопии.
Людмила Сергеевна Ляшенко – кандидат физико-математических наук; доцент кафедры лазерной физики и спектроскопии физического факультета.

Authors:

Eugene Voropay, doctor of science (physics and mathematics), full professor; head of the department of laser physics and spectroscopy, faculty of physics.
voropay@bsu.by
Michael Samtsov, doctor of science (physics and mathematics); head of the laboratory of spectroscopy.
samtsov@bsu.by
Lyudmila Lyashenko, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of laser physics and spectroscopy, faculty of physics.
lyashenko@bsu.by

of biotissues when fluorescence is recorded *in vivo* over the spectral range 710–900 nm, the wavelength of laser sources used for excitation should be above 676 nm. It has been shown that the use of a C3C-20 absorption light filter revealing no luminescence over the spectral range under study is optimal to lower in a spectrometer a level of scattered light from the excitation laser ($\lambda = 682$ nm) by three orders. By scanning an optical fiber over the surface of the tumor node, it has been demonstrated that in the case of necrotic tissues the fluorescence signal of polymethine dye in this region is lower by a factor of 3–5 as compared to other parts of the tumor.

Key words: polymethine dyes; fluorescence recording; *in vivo*; photoactivity.

Органические соединения, поглощающие и испускающие световое излучение в ближнем инфракрасном диапазоне, в настоящее время все шире применяются в биологии и медицине в качестве флуоресцентных зондов различного назначения. Подобные соединения считаются наиболее перспективными для использования в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии. Весомым преимуществом фотодинамической терапии перед традиционными методами лечения онкологических заболеваний является целенаправленное воздействие непосредственно на опухолевую ткань.

Среди названных соединений существенный интерес представляют индотрикарбоцианиновые красители, имеющие полосу поглощения в окне прозрачности биотканей и обладающие высоким молярным коэффициентом поглощения в этой полосе [1; 2]. Для применения соединений этого класса в медико-биологических целях требуется проведение анализа их флуоресцентных свойств в биологических системах. При регистрации флуоресценции красителей в биотканях возникают проблемы с достоверностью полученных результатов, поэтому необходимо учитывать особенности оптических характеристик самих биотканей. Трудности с корректной регистрацией флуоресцентных характеристик обусловлены высоким уровнем рассеяния света в биотканях [3], наличием в них эндогенных биомолекул с достаточно интенсивным свечением [4], неравномерным распределением кровеносных сосудов, а также изменениями оптических свойств тканей от усилия, с которым конец световода прикладывается к исследуемому участку биоткани [5].

Цель настоящей работы – определение оптимальных условий, которые обеспечивают возможность корректной регистрации характеристик фотолюминесценции полиметиновых красителей (ПК) в тканях *in vivo* с помощью спектрометра с вводом излучения через световод.

Материалы и методика исследования

Объектами изучения выступали индотрикарбоцианиновые красители, разработанные в лаборатории спектроскопии научно-исследовательского учреждения «Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко» БГУ [6]. В качестве лабораторных животных использованы белые беспородные крысы с перевивными опухолями штамма «саркома М-1». Для установления локализации злокачественных новообразований, получения информации о фармакокинетике фотосенсибилизатора необходимо использовать спектрометрическую аппаратуру, которая позволяет регистрировать спектры флуоресценции за 1–2 с. В целях определения относительной интенсивности сигнала свечения и анализа формы спектров флуоресценции *in vivo* использован разработанный спектрометрический комплекс [7]. Для регистрации спектров флуоресценции фотосенсибилизаторов *in vivo* для возбуждения использовалось несколько источников излучения: HeNe-лазер с $\lambda = 632,8$ нм, криптоновый лазер с длиной волны λ , равной 647 или 676 нм, а также полупроводниковый лазер с $\lambda = 682$ нм. Подвод возбуждающего излучения к исследуемому объекту и регистрация флуоресценции осуществлялись с помощью оптического волокна. Оптическая система состоит из излучателя-светоколлектора, малогабаритного полихроматора и блока фотоприемника. Излучатель-светоколлектор включает в себя систему сбора и подвода излучения на вход полихроматора. Система регистрации спектрометра организована на основе многоканального фотодетектора (3648-канальная ПЗС-линейка) на выходе малогабаритного полихроматора и интерфейсной платы пересылки экспериментальных данных в персональный компьютер. Обратная линейная дисперсия малогабаритного полихроматора составляет 22 нм/мм, спектральный диапазон – 400...950 нм. Дисперсионный элемент в полихроматоре – плоская дифракционная решетка с 600 штрихами на 1 мм и максимумом отражения при $\lambda = 750$ нм.

Результаты экспериментов и их обсуждение

Собственная люминесценция биологических тканей в спектральном диапазоне 700–900 нм искажает форму регистрируемого спектра флуоресценции полиметиновых красителей в биологических системах. Коэффициент поглощения эндогенных молекул, способных флуоресцировать, уменьшается при увеличении длины волны возбуждающего излучения [8], поэтому в случае возрастания длины его волны ожидаемо будет происходить понижение уровня их свечения. Приближение длины волны

возбуждающего излучения к максимуму поглощения ПК способствует росту интенсивности флуоресценции ПК, но уменьшение спектрального интервала между возбуждением и регистрируемой флуоресценцией приводит к увеличению в спектрометре уровня рассеянного света в информационном спектральном диапазоне. Для снижения влияния собственного свечения биотканей проведен поиск оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции.

При использовании для возбуждения флуоресценции тканей крысы, которой не вводился фотосенсибилизатор (т. е. интактной), излучения с длиной волны 632,8 или 647,1 нм в спектральной области флуоресценции красителя регистрируется значительный сигнал автолюминесценции тканей мышц, опухоли, кожи и внутренних органов животного. Спектры флуоресценции при возбуждении излучением 632,8 нм представлены на рис. 1 (I – количество квантов света в единицу времени в единичном спектральном интервале, отн. ед.). Видно, что спектр флуоресценции ткани интактной крысы имеет ярко выраженный максимум при длине волны 705 нм. Излучение в данной области обусловлено наличием эндогенных порфиринов [8], молекулы которых достаточно эффективно возбуждаются излучением с длиной волны 632,8 нм. При малых концентрациях фотосенсибилизатора сигнал автолюминесценции тканей имеет примерно такой же уровень, как и флуоресценция красителя.

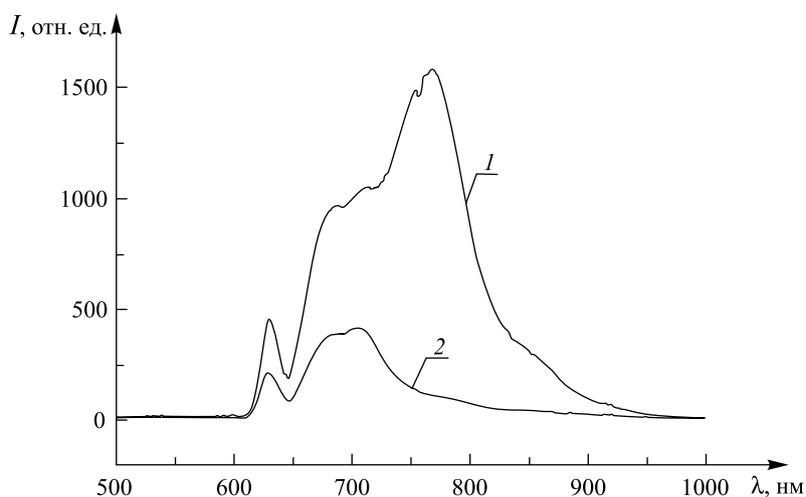


Рис. 1. Спектры флуоресценции ПК *in vivo* (1) и спектр флуоресценции тканей интактных крыс (2) при возбуждении $\lambda = 632,8$ нм

Fig. 1. Fluorescence spectra of PD *in vivo* (1) and a fluorescence spectrum of the intact rat tissues (2) for the excitation wavelength $\lambda = 632.8$ nm

Высокий уровень собственной люминесценции тканей при возбуждении данными источниками регистрируется от поверхности всех тканей внутренних органов крысы. При переходе к источникам излучения с λ , равной 676,4 или 682 нм, интенсивность свечения тканей интактной крысы резко уменьшается. Практически исчезает люминесценция опухоли, а спектр флуоресценции фотосенсибилизатора в опухоли приобретает характерную для ПК форму (рис. 2). Небольшой коротковолновый максимум с $\lambda = 682$ нм обусловлен проявлением в спектрах возбуждающего света лазерного источника.

Таким образом, чтобы уменьшить влияние собственного свечения биотканей при регистрации флуоресценции в спектральном диапазоне 710–900 нм *in vivo*, для возбуждения следует использовать излучение лазерных источников с длиной волны более 676 нм.

В целях снижения уровня рассеянного света на входе спектрометра необходимо устанавливать отсекающие светофильтры. При выборе фильтра важно, чтобы он не оказывал влияния на форму регистрируемого спектра флуоресценции, пропускал излучение в области флуоресценции ПК и подавлял уровень рассеянного света. Приемлемыми для этой цели в спектральной области 700–950 нм являются светофильтры КС-19 и СЗС-20. Поскольку большинство абсорбционных цветных светофильтров обладают фотолюминесценцией, данное свечение может накладываться на спектр регистрируемой флуоресценции. В связи с этим проведен анализ спектров фотолюминесценции использованных светофильтров с помощью спектрофлуориметра Spex Fluorolog. Полуширина полосы излучения полупроводникового лазера с $\lambda = 682$ нм составляет 1,5 нм и расположена в 30 нм от начала пропускания системы фильтров КС-19 и СЗС-20, дополнительных малоинтенсивных полос излучения лазера в области пропускания фильтров не обнаружено. В случае возбуждения фильтра КС-19 излучением лазера с $\lambda = 682$ нм регистрируется достаточно интенсивное свечение, при этом каких-либо полос фотолюминесценции фильтра СЗС-20 не проявляется. На рис. 3 представлены спектры пропускания (T – коэффициент пропускания) и нормированные спектры люминесценции фильтров КС-19 и СЗС-20.

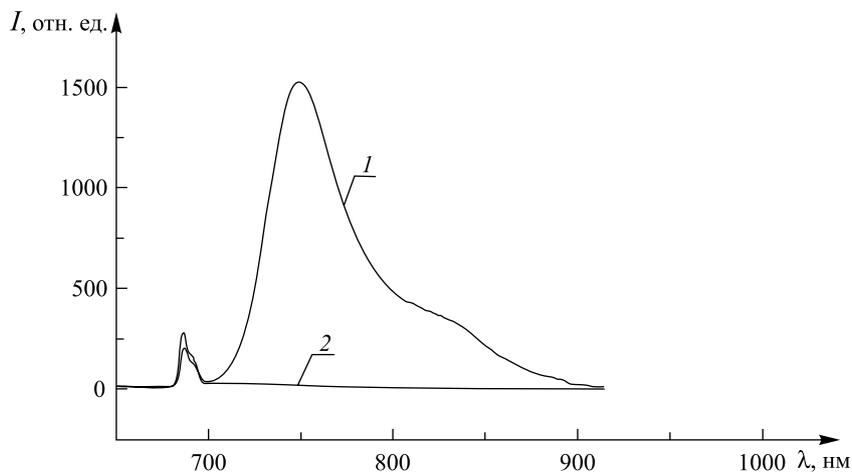


Рис. 2. Спектры флуоресценции ПК *in vivo* (1) и спектры испускания опухолевой ткани интактной крысы (2) при возбуждении $\lambda = 682$ нм
Fig. 2. Fluorescence spectra of PD *in vivo* (1) and emission spectra for tumor tissues of the intact rat (2) at $\lambda = 682$ nm

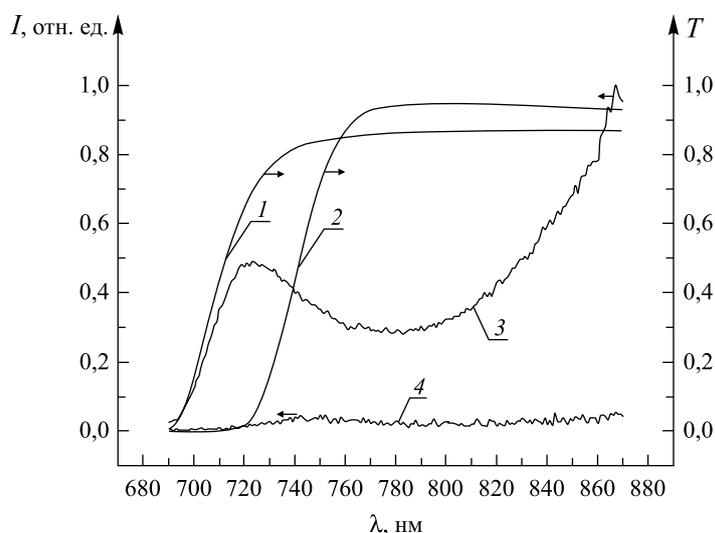


Рис. 3. Спектры пропускания фильтров КС-19 (1) и СЗС-20 (2), спектр фотолюминесценции фильтров КС-19 (3) и СЗС-20 (4)
Fig. 3. Transmission spectra of the filters KC-19 (1) and C3C-20 (2), photoluminescence spectra of the filters KC-19 (3) and C3C-20 (4) in random units

Следовательно, для ограничения уровня рассеянного возбуждающего света полупроводникового лазера с $\lambda = 682$ нм предпочтительнее использовать светофильтр марки СЗС-20.

При проведении сеансов фотодинамической терапии по анализу флуоресценции определяют одну из важнейших характеристик временной зависимости концентрации фотосенсибилизатора в тканях – фармакокинетику препарата. В последнее время также получили распространение методики определения соотношения концентраций фотосенсибилизаторов в различных органах путем сравнения интенсивности их флуоресценции. Естественно, что при использовании таких методик требуется подтверждение линейной зависимости величины сигнала флуоресценции от концентрации фотосенсибилизатора в тканях. Возможным отклонением от данной зависимости при этом может быть проявление тривиального перепоглощения вследствие значительного перекрытия спектров поглощения и флуоресценции ПК. Изменение формы спектра либо сопровождается изменением квантового выхода флуоресценции фотосенсибилизатора, либо свидетельствует о некорректности эксперимента. В таких случаях регистрируемый сигнал флуоресценции не может быть прямо пропорционален концентрации фотосенсибилизатора. Следовательно, без анализа спектров флуоресценции на протяжении всего времени наблюдения нельзя уверенно говорить о пропорциональности уровня сигнала флуоресценции фотосенсибилизатора его концентрации.

Одним из факторов, требующих внимания при регистрации сигнала флуоресценции фотосенсибилизатора *in vivo*, является различная толщина исследуемых образцов. Для определения размеров области, с которой регистрируется флуоресценция красителя в конкретных экспериментальных условиях, проведен анализ влияния толщины образцов тканей на величину сигнала флуоресценции. Экспериментально установлено, что флуоресценция регистрируется от молекул красителя, находящихся не только в коже и непосредственно прилегающих к ней слоях опухолевой ткани, но и на глубине до 1,5 см. На основании теории переноса излучения построена математическая модель процесса регистрации сигнала флуоресценции красителя, находящегося в биологической ткани. Суммарная интенсивность флуоресценции на поверхности ткани в направлении световода рассчитывалась по формуле

$$F(0, \infty) = \varphi_f \int_0^{\infty} E(0, z) \cdot \Phi(z) \mu_{a\Phi C} dz,$$

где $\Phi(z)$ – интегральная интенсивность света на глубине z , определялась из диффузионного уравнения теории переноса; $\mu_{a\Phi C}$ – коэффициент поглощения фотосенсибилизатора; φ_f – квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора. Доля света флуоресценции, которая достигает поверхности ткани от молекул красителя на глубине z , определялась по формуле

$$E(0, z) = \frac{1}{2} \exp(-\mu_{\text{eff}} z) \cdot \left[1 + \exp\left(-\frac{4A\mu_{\text{eff}}}{3\mu'_t}\right) \right],$$

где $\mu'_t = \mu_s(1-g) + \mu_a$; $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1-g))}$ – коэффициент эффективного ослабления, μ_s – коэффициент рассеяния ткани, μ_a – коэффициент поглощения ткани, g – параметр анизотропии; A – параметр, зависящий от коэффициента преломления ткани и окружающей среды.

Сравнение теоретической функции $F(0, z)$ с экспериментальной зависимостью величины сигнала флуоресценции от толщины образца (Δ , мм) позволило численными методами рассчитать параметры среды, при которых на практике наблюдается их совпадение (рис. 4).

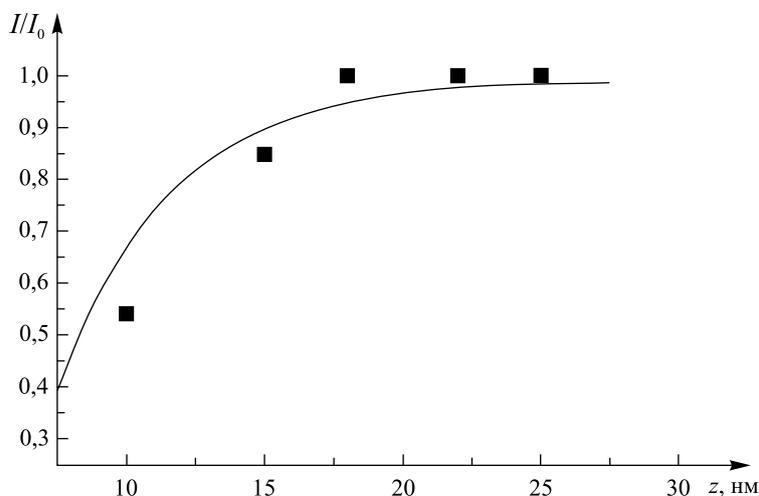


Рис. 4. Зависимости – рассчитанная (сплошная линия) и экспериментальная (точки) – сигнала флуоресценции ПК от толщины опухолевой ткани
Fig. 4. The calculated (solid line) and experimental (points) curves for the PD fluorescence signal as a function of the tumor tissue thickness

Неровности на поверхности опухоли, неоднородности (очаги некрозов ее тканей) могут приводить к значительному разбросу в интенсивности сигнала, фиксируемого с поверхности тела подопытного животного [5]. В целях определения влияния неоднородностей тканей опухолевых узлов на регистрацию сигнала флуоресценции для штамма «саркома М-1» были проведены исследования распределения красителей непосредственно в объеме опухолевой ткани. Для эксперимента отбирались сплошные опухоли, а также опухоли с некрозом тканей и проводилось сканирование сигнала флуоресценции по плоскости срезов опухоли. Эксперимент показал отличие содержания красителя у поверхности и внутри опухоли не более чем на 7 % в сплошных, без спонтанных некрозов, опухолях. Если же в опухоли

содержалась область со спонтанным некрозом, то в этой зоне сигнал флуоресценции красителя был меньше, чем в остальной части опухолевого узла, в 3–5 раз, так как в некротическую область затруднено поступление красителя из-за отсутствия кровотока. Следовательно, сравнение сигнала флуоресценции красителя по нескольким точкам поверхности опухоли свидетельствует о достоверности определения ее интенсивности. Значительные различия (в несколько раз) в величине сигнала являются основанием для отбраковки испытуемых животных.

Заключение

По представленным результатам проведен подбор оптимальных условий для регистрации *in vivo* сигнала флуоресцентных зондов на основе ПК с помощью спектрометрического комплекса. Показано, что оборудование, применяемое для измерений спектров флуоресценции в биологических тканях, должно обеспечивать оперативную регистрацию спектров от биообъектов, ограничивать уровень рассеянного и отраженного тканью света источника возбуждения, а также в максимальной степени уменьшать долю свечения эндогенных биомолекул в регистрируемом спектре.

Исследования выполнены при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Ф16Р-131, Ф16Р-209, Ф16МВ-006) и Министерства образования Республики Беларусь.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Фотодинамическая лазерная терапия и диагностика областей локализации на основе новых типов фотосенсибилизаторов / Е. С. Воропай [и др.] // Изв. РАН. Сер. физ. 2007. Т. 71, № 1. С. 145–149.
2. Спектрально-люминесцентные свойства индотрикарбодцианинового красителя в биотканях / М. П. Самцов [и др.] // Журн. прикл. спектроскопии. 2010. Т. 77, № 3. С. 438–444.
3. Optical properties of *in vitro* epidermis and their possible relationship with optical properties of *in vivo* skin / R. Marchesini [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B. 1992. Vol. 16, No. 2. P. 127–140.
4. Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Саратов, 1998.
5. Синичкин Ю. П. *In vivo* отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека. Саратов, 2001.
6. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии злокачественных опухолей : пат. 15767 Респ. Беларусь, С 07 D 209/04, С 09 В 23/06, А 61 Р 35/00 / М. Л. Самцов, А. П. Луговский, Е. С. Воропай, П. Т. Петров, А. А. Луговский, Д. И. Демид, Л. С. Ляшенко, Е. Н. Александрова, Ю. П. Истомин ; заявитель Белорус. гос. ун-т. № а 20101007 ; заявл. 30.06.2010 ; опубл. 18.01.2012 // Афіцыйны бюл. 2012. № 2. С. 105.
7. Лазерный спектрометрический комплекс для флуоресцентной диагностики области локализации опухолей / М. П. Самцов [и др.] // Квантовая электроника : материалы V Междунар. науч.-техн. конф. (Минск, 22–25 нояб. 2004 г.). Минск, 2004. С. 20–24.
8. Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy *in vivo* // *Encycl. anal. chem.* / ed. by R. A. Meyers. 2000. P. 20–56.

REFERENCES

1. Voropai E. S., Samtsov M. P., Kaplevskii K. N., et al. Fotodinamicheskaya lazernaya terapiya i diagnostika oblastei lokalizatsii na osnove novykh tipov fotosensibilizatorov [Photodynamic laser therapy and diagnostics of tumor localization on the basis of new types of photosensitizers]. *Izv. RAN. Ser. phys.* 2007. Vol. 71, No. 1. P. 145–149 (in Russ.).
2. Samtsov M. P., Voropay E. S., Melnikov D. G., et al. Spektral'no-lyuminestsentnye svoistva indotrikarbotsianinovogo krasitelya v biotkanyakh [Spectral-Fluorescent Properties of an Indotricarbocyanine Dye in Biological Tissues]. *Zhurnal prikl. spektrosk.* 2010. Vol. 77, No. 3. P. 438–444 (in Russ.).
3. Marchesini R., Clemente C., Pignoli E., et al. Optical properties of *in vitro* epidermis and their possible relationship with optical properties of *in vivo* skin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1992. Vol. 16, No. 2. P. 127–140. DOI: 10.1016/1011-1344(92)80004-F.
4. Tuchin V. V. Lazery i volokonnaya optika v biomeditsinskikh issledovaniyakh. Saratov, 1998 (in Russ.).
5. Sinichkin Yu. P. *In vivo* otrazhatel'naya i fluorestsennaya spektroskopiya kozhi cheloveka. Saratov, 2001.
6. Fotosensibilizator dlya fotodinamicheskoi terapii zlokachestvennykh opukholei : pat. 15767 Resp. Belarus', С 07 D 209/04, С 09 В 23/06, А 61 Р 35/00 / М. Л. Самцов, А. П. Луговский, Е. С. Воропай, П. Т. Петров, А. А. Луговский, Д. И. Демид, Л. С. Ляшенко, Е. Н. Александрова, Ю. П. Истомин ; заявитель Белорус. гос. ун-т. № а 20101007 ; заявл. 30.06.2010 ; опубл. 18.01.2012. Afitsyiny byul. 2012. No. 2. S. 105 (in Russ.).
7. Samtsov M. P., Rad'ko A. E., Kaplevskii K. N., et al. Lazernyi spektrometricheskii kompleks dlya fluorestsentnoi diagnostiki oblasti lokalizatsii opukholei. *Kvantovaya elektronika* : materialy V Mezhdunar. nauchn.-tekhnicheskoi konf. (Minsk, 22–25 Novemb. 2004). Minsk, 2004. P. 20–24 (in Russ.).
8. Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy *in vivo*. *Encycl. anal. chem.* Ed. by R. A. Meyers. 2000. P. 20–56.

Статья поступила в редколлегию 11.05.2016.
Received by editorial board 11.05.2016.