

ОПТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЗОНДОВ В БИОТКАНЯХ ПРИ ПАТОЛОГИИ И В НОРМЕ

Установлено, что для уменьшения влияния собственного свечения биотканей *in vivo* при регистрации флуоресценции зонда в спектральном диапазоне 710-900 нм следует использовать для возбуждения излучение лазерных источников с длиной волны более 676 нм, для обеспечения пропорциональности сигнала флуоресценции зонда его концентрации необходимо контролировать глубину проникновения света и форму спектров флуоресценции.

Полиметиновые красители с полосой поглощения и спектром испускания в ближнем инфракрасном диапазоне используются в качестве биосенсоров различного назначения [1], на их основе разрабатываются фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии [2-4]. Применение полиметиновых красителей в медико-биологических аспектах предполагает проведение анализа их флуоресцентных свойств в биологических системах. При регистрации флуоресценции красителей в биотканях мешающими факторами являются особенности оптических характеристик таких систем. Трудности с корректной регистрацией флуоресцентных характеристик обусловлены высоким уровнем рассеяния света в биотканях, наличием в них эндогенных биомолекул с достаточно интенсивным свечением, неравномерным распределением кровеносных сосудов, изменениями оптических свойств тканей при механическом надавливании, а также различия в размерах образцов. Для осуществления корректной регистрации спектров люминесценции полиметиновых красителей *in vivo* с помощью спектрометрического комплекса проведен выбор оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции и светофильтров подавляющих уровень рассеянного света.

В качестве объектов исследования использовались индотрикарбоцианиновые красители, разработанные в лаборатории спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко. В разработанном компактном спектрометрическом комплексе для регистрации спектров флуоресценции фотосенсибилизаторов *in vivo* для возбуждения использовано излучение полупроводникового лазера с длиной волны $\lambda=682$ нм. Система регистрации спектрометра организована на основе многоканального фотодетектора (3648 канальная ПЗС линейка) на выходе малогабаритного полихроматора и интерфейсной платы пересылки экспериментальных данных в ПЭВМ. Обратная линейная дисперсия малогабаритного полихроматора составляет 22 нм/мм, спектральный диапазон - 400÷950 нм. Дисперсионный элемент в полихроматоре – плоская дифракционная решетка с 600 штр/мм и максимумом отражения на 750 нм. Анализируемое излучение вводится в полихроматор световодом с расположением волокон в линию, которые служат в качестве входной щели спектрометра.

Собственная люминесценция биологических тканей в спектральном диапазоне 710-900 нм оказывает негативное воздействие на форму регистрируемого спектра флуоресценции ПК в таких системах. Для уменьшения влияния собственного свечения биотканей проведен поиск оптимальной длины волны возбуждения флуоресценции. В качестве возбуждающего излучения в спектрометрическом комплексе использовано излучение газовых лазеров с длиной волны 632,8 нм, 647,1 нм и 676 нм и полупроводникового с $\lambda=682$ нм. При использовании для возбуждения флуоресценции опухолевой ткани интактной крысы излучения с длиной волны 632,8 нм или 647,1 нм в спектральной области флуоресценции красителя регистрируется значительный сигнал автolumинесценции тканей (рис.1-2). Максимум в спектре флуоресценции тканей интактной крысы расположен в районе 700 нм. Флуоресценция в данной области обу-

словлена присутствием в тканях эндогенных порфиринов. При переходе к источникам излучения с $\lambda = 676,4$ нм или 682 нм интенсивность спектров испускания ткани интактной крысы резко уменьшается. Практически исчезает люминесценция опухоли интактной крысы, а спектр флуоресценции фотосенсибилизатора в опухоли приобретает характерную для ПК форму. Следовательно, оптимальным источником возбуждения флуоресценции в биологических структурах (*in vitro* и *in vivo*) является излучение лазерных источников с длиной волны генерации 676 нм или 682 нм.

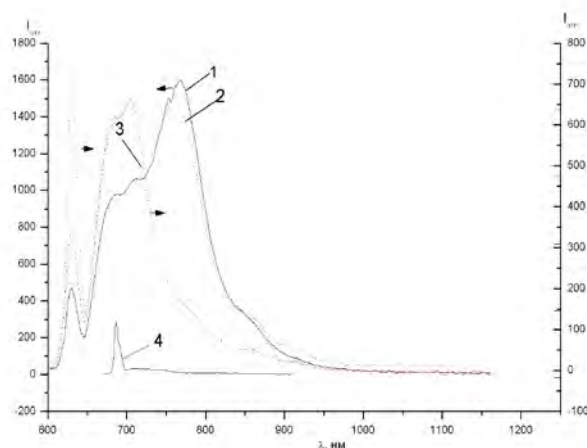


Рис. 1 Спектры флуоресценции ПК (1,2) при возбуждении излучением с $\lambda = 632.8$ нм в опухолевых узлах М1 через сутки (1) и трое суток (2) после введения, спектр флуоресценции интактных крыс (3). Спектры испускания опухолевой ткани интактной крысы (4) зарегистрированы при возбуждении $\lambda = 682$ нм.

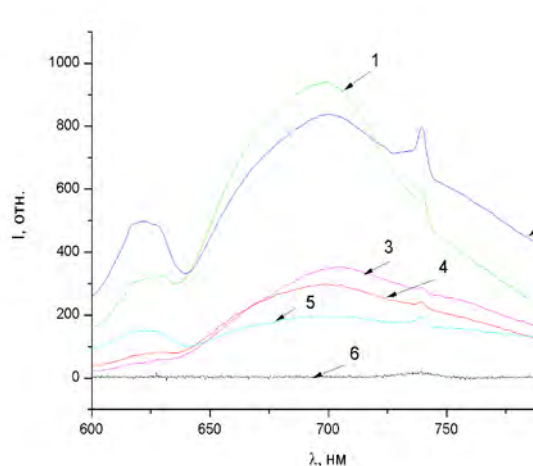


Рис. 2 Автолюминесценция внутренних органов крыс при возбуждении 632 нм: 1- бедро, 2- почки, 3- селезенка, 4- печень, 5- сердце, 6 – печень.

Полуширина полосы излучения полупроводникового лазера с $\lambda=682$ нм составляет 1.5 нм и имеет расположение в 30 нм от начала пропускания системы фильтров КС-19 и СЗС-20, дополнительных малоинтенсивных полос излучения лазера в области пропускания фильтров не обнаружено. На основании анализа спектров свечения абсорбционных фильтров при возбуждении излучением лазера 682 нм установлено, что указанная длинноволновая полоса обусловлена свечением фильтра КС-19. Следовательно, в качестве ограничивающего уровень мешающего рассеянного возбуждающего света полупроводникового лазера таком использовании спектрометра предпочтительней использование фильтра марки СЗС-20.

Пробник-светоколлектор обеспечивает возможность подвода возбуждающего излучения к образцу и сбор света флуоресценции. Светоколлектор экранирует от попадания внешнее излучение на выделенный участок поверхности образца, является держателем световода. Половина волокон световода служит для подвода к поверхности образца возбуждающего излучения полупроводникового лазера, вторая часть обеспечивает пересылку анализируемого излучения к полихроматору. С целью уменьшения погрешности измерений разработан наконечник для световода. Наконечник позволил увеличить площадь поверхности, на которую подводится возбуждающее излучение и с которой осуществляется регистрация флуоресценции. Это позволило создать идентичные условия при соприкосновении этого элемента оптической системы с поверхностью биотканей, а также усреднить сигнал флуоресценции по площади ограниченной корпусом отражателя и уменьшить уровень мешающего внешнего излучения. При регистрации сигнала флуоресценции с использованием разработанного устройства отклонение от среднего значения сигнала уменьшилось почти на порядок. Одной из важнейших ха-

рактических временной зависимости концентрации фотосенсибилизаторов в тканях, которую можно определять с помощью анализа флуоресценции, является фармакокинетика. 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 соответствия величины сигнала флуоресценции с концентрацией фотосенсибилизатора в тканях. Возможными мешающим фактором при этом может быть проявление тривиального перепоглощения вследствие перекрытия спектров поглощения и флуоресценции фотосенсибилизаторов. В любом случае изменение формы спектра сопровождается либо реальным изменением квантового выхода флуоресценции фотосенсибилизатора либо сигнализирует о некорректности эксперимента. В таких случаях регистрируемый сигнал флуоресценции не может быть прямо пропорционален концентрации фотосенсибилизатора, как при сравнении между собой сигналов флуоресценции сенсибилизатора в разных органах, так и при регистрации закономерности изменения их концентрации со временем.

Таким образом, без анализа спектров флуоресценции на протяжении всего времени наблюдения нельзя уверенно утверждать о пропорциональности уровня сигнала флуоресценции фотосенсибилизатора с его концентрацией. Для обеспечения достоверности следует регистрировать спектры флуоресценции красителей *in vivo* наряду с анализом формы и положения спектров флуоресценции при введении хотя бы двух концентраций фотосенсибилизатора.

Список литературы

1. Fortina P, Delgrosso K, Sakazume T, Santacrose R, Moutereau S, Su HJ, Graves D, McKenzie S, Surrey S. Simple two-color array-based approach for mutation detection// Eur. J. Hum. Genet. 2000. V. 8. P. 884 – 894.
2. Е.С. Воропай, М.П. Самцов, К. Н. Каплевский, Д.Г. Мельников, Л.С. Ляшенко. Фотодинамическая лазерная терапия и диагностика областей локализации на основе новых типов фотосенсибилизаторов // Известия РАН. Серия физическая 2007, том 71, № 1, С. 145 – 149
3. М.П. Самцов, Е.С. Воропай, К.Н. Каплевский, Д.Г. Мельников, Ю.П. Истомин, Л.С. Ляшенко Влияние энергии фотона на эффективность фотохимиотерапии // Журнал Прикладной Спектроскопии. – 2009. - Т. 76, № 4. - С. 576 – 582.
4. М. П. Самцов, Е.С. Воропай, Л.С. Ляшенко, Д.Г. Мельников, К.Н. Каплевский, А.П. Луговский Флуоресценция фотосенсибилизатора на основе индотрикарбодинового красителя при фотохимиотерапии // Журнал Прикладной Спектроскопии. – 2011. – Т. 78, №1. - С. 121 – 127.

It is found that to reduce the impact of its own glow of tissues *in vivo* with the registration of the fluorescence of the probe in the spectral range of 710-900 nm should be used for the excitation laser light sources with wavelengths greater than 676 nm. In order to ensure the proportionality of the fluorescence signal of the probe to its concentration must be controlled the penetration depth of light and shape of the fluorescence spectra.

Тарасов Д.С., м.н.с. НИИПФП им. А.Н.Севченко БГУ, Минск, Беларусь, e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru.