

Список литературы

1. Арнольд И.Н. // Изв. отдела прикладной ихтиологии и научно-промышленных исслед. 1924. Т. 2, № 1. С. 117–129.
2. Боголюбов М.В. Медицинская реабилитация. Том I. Пермь, 1998.
3. Кашицкий Э.С., Гудак С.П., Силивончик Н.Н. // Изв. Белорусской инженерной академии. 2000. № 1 (9). С. 55–62.

УДК 535.8

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА *IN VIVO***И.В. ЯКОВЕЦ^{1,2,3}, И.В. ЯНКОВСКИЙ^{1,2,3}, Л.Н. БОЛОТИНА^{2,3}, В.П. ЗОРИН^{1,4}¹ Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь² Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7039,
Université de Lorraine, Campus Sciences, Vandœuvre-lès-Nancy, France³ Institut de Cancérologie de Lorraine
6 Avenue de Bourgogne, 54519, Vandœuvre-lès-Nancy, France⁴ Международный государственный экологический институт им. Сахарова
Долгобродская, 23, 220070, Минск, Беларусь

Поступила в редакцию 21 ноября 2016

Рассмотрены два подхода к анализу процессов распределения фотосенсибилизатора. Темпрофин изучен на моделях животных опухоленосителей *in vivo* путем измерений прижизненной флуоресценции. Продемонстрирована эффективность применения техники поверхностного флуоресцентного имиджинга и контактной оптоволоконной спектрометрии для получения оперативной и наглядной информации о процессах локализации фотосенсибилизатора в тканях и организме *in vivo*.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, прижизненная флуоресценция, фотодинамическая терапия.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является относительно новым методом лечения онкологических и ряда других заболеваний, в основе которого лежит использование видимого света и специальных веществ фотосенсибилизаторов (ФС) [1]. Исходя из общих соображений, результативность ФДТ зависит от трех главных факторов: фотофизических свойств ФС, т.е. его способности трансформировать энергию возбуждающего света в энергию химически активных интермедиаторов фотосенсибилизированных реакций, режима фотооблучения и фармакокинетики препарата в организме. Исследования последних лет показывают, что процессы распределения ФС в организме играют основную роль с точки зрения определения результативности ФДТ. Это связано с тем, что синглетный кислород, основной интермедиатор фотохимических процессов, вследствие малого времени жизни в водной среде способен повреждать только те биологические структуры, которые находятся в непосредственной близости к местам локализации молекул ФС. В результате многочисленных исследований к настоящему времени отобран ряд ФС, обладающих фотофизическими свойствами близкими к оптимальным, поэтому дальнейшее развитие техники ФДТ связывают с получением ФС, характеризующегося оптимальной фармакокинетикой. Изменение параметров биораспределения ФС возможно посредством модификации его физико-химических свойств,

определяющих процессы взаимодействия его молекул с клеточными и тканевыми структурами. Еще одним способом контролируемого изменения фармакокинетики ФС может быть использование для его введения специальных фармакологических форм или систем доставки лекарственных соединений.

Материалы и методика эксперимента

Системы доставки лекарственных средств – это пролонгированные лекарственные формы, в которые лекарственное вещество растворено или диспергировано в массе носителя. Размеры таких носителей варьируются от нескольких единиц до нескольких сотен нанометров. К числу наноносителей относят дендримеры, мицеллы, липосомальные формы, полимерные наночастицы, циклодекстрины и др. Использование подобных лекарственных систем доставки является наиболее перспективным способом введения многих лекарственных соединений, включая ФС для целей ФДТ. Для отбора и оптимизации систем доставки с целью повышения результативности необходимы объективные физико-химические методы контроля распределения препаратов на различных уровнях биологической организации. При исследовании процессов распределения ФС в организме наиболее приемлемыми являются неинвазивные флуоресцентные методы регистрации наличия ФС в различных тканях и органах. Данные методы позволяют регистрировать прижизненную флуоресценцию ФС в тканях в условиях *in vivo*, при этом регистрация ФС происходит в реальном времени [2]. Цель настоящего исследования – оценка возможностей использования различных физико-химических методов для мониторинга процессов распределения фотосенсибилизатора Темопорфина, вводимого в свободном виде и в составе комплексов включения с циклодекстринами. Темопорфин является одним из наиболее эффективных фотосенсибилизаторов второго поколения, в 2001 году был одобрен Евросоюзом для клинического применения при паллиативном лечении пациентов с поздними стадиями рака головы и шеи [3]. Данный ФС плохо растворим в воде, поэтому для его введения в кровь, необходимо использовать специальные фармакологические формы.

Для проведения эксперимента был использован темопорфин, предоставленный компанией Biolitec Research GmbH (Германия). Эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями законодательства и нормами Республики Беларусь и Европейского союза. Все эксперименты проводились под общей анестезией изофлюраном (Франция) с помощью анестезиологического аппарата Univentor 400 (Франция). Мыши содержались в шкафах для животных с фильтрацией воздуха и с 12-часовым циклом «день-ночь» при температуре 22–24 °С и 5 % относительной влажности, с непрерывным доступом к воде и корму. Все операции проводились в асептических условиях.

Результаты и их обсуждение

Поверхностный флуоресцентный имиджинг. Для наблюдения распределения ФС *in vivo* на уровне организма, как правило, используют технику поверхностного флуоресцентного имиджинга [4, 5]. Данная методика позволяет наблюдать биологический объект целиком, продолжительное время изучать процессы распределения на одном животном, учитывая его индивидуальные особенности. Поверхностный флуоресцентный имиджинг позволяет оперативно (в течение 1–2 с) оценивать параметры распределения флуоресцирующего агента, находящегося вблизи поверхности исследуемого биологического объекта. Для обнаружения флуоресценции тканей, удаленных от поверхности, применяются высокочувствительные приемники, однако в этом случае получаемые изображения заметно искажаются из-за сильного рассеяния света биотканями. Установка для поверхностного флуоресцентного имиджинга является комплексом высокочувствительной аппаратуры, предназначенной для проведения исследований флуоресценции биологических объектов, в том числе лабораторных животных. На рис. 1 представлен внешний вид данной установки. Данная установка применяется для решения различных научно-технических задач и позволяет неинвазивно регистрировать

процессы распределения ФС внутри живых организмов в режиме реального времени. На рис. 2 представлена схема расположения основных узлов и элементов установки.

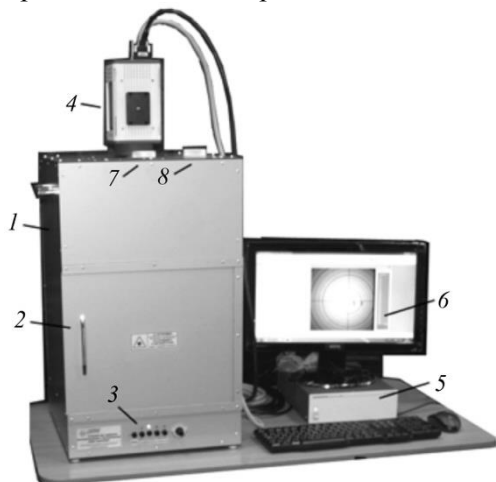


Рис. 1. Внешний вид установки:
1 – светозащитный корпус, 2 – выдвижная дверца светозащитного корпуса (в закрытом состоянии), 3 – панель управления источниками, 4 – охлаждаемая ПЗС камера,
5 – блок питания ПЗС камеры, 6 – монитор ПК, 7 – крышка отверстия для установки светофильтров, 8 – рукоятка поворота диска со светофильтрами

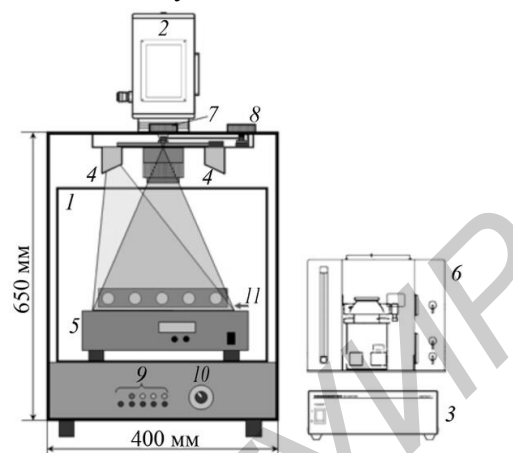


Рис. 2. Схема расположения основных узлов и элементов установки : 1 – выдвижная дверца светозащитного корпуса, 2 – охлаждаемая ПЗС камера, 3 – блок питания ПЗС камеры, 4 – сверхяркие светодиодные источники, 5 – платформа системы подогрева и анестезии лабораторных животных, 6 – газовый пост системы подогрева и анестезии, 7 – крышка отверстия для установки светофильтров, 8 – рукоятка поворота диска со светофильтрами, 9 – кнопки коммутации источников, 10 – переключатель ступенчатой регулировки интенсивности излучения источников, 11 – плоскость расположения объекта исследования

В качестве источников оптического излучения для возбуждения флуоресценции в установке используются малогабаритные сверхяркие светодиодные источники видимого диапазона. Наблюдение флуоресценции ФС проводится через определенные временные промежутки после внутривенного введения в организм мышей-опухоленосителей. Животное горизонтально фиксируется на подставке в «темной» камере, где освещается световым пучком в узком спектральном диапазоне (для возбуждения флуоресценции Темпорфина используется излучение с длиной волны 535 нм). Флуоресценция, возбужденная в тканях животного, регистрируется охлаждаемой камерой (ORCA II BT-512G, Hamamatsu Photonics). Для разделения флуоресценции и зондирующего излучения на объектив ПЗС-камеры устанавливается интерференционный фильтр (Chroma Technology Co., США) с полосой пропускания 628–672 нм.

Оптоволоконная спектрометрия. Использование оптоволоконной спектрометрии позволяет проводить локальный анализ спектрально-флуоресцентных характеристик приповерхностного слоя биологического образца. В последнее время данный метод нашел широкое применение при изучении кинетических процессов накопления и выведения ФС во внутренних органах. В некоторых случаях возможен не только контроль изменения уровня ФС в органе-мишени, но и количественное определение концентрации сенсibilизатора в режиме реального времени. Установка для такого анализа представляет собой источник лазерного излучения, оптический световод с возможностью сбора света, излучаемого тканью и спектрометр, осуществляющий спектральный анализ получаемых данных. На рисунке 3 представлена принципиальная схема установки для локальной регистрации прижизненной флуоресценции с использованием оптоволоконных световодов. Согласно приведенной схеме, свет от возбуждающего источника (длина волны 540 нм, мощность излучения 0,5 мВт/см²) поступает в центральную жилу оптоволоконного световода. Периферический конец оптоволокна приводился в прямой контакт с исследуемой тканью. Флуоресцентный сигнал

ткани регистрируется на длине волны 650 нм в периферических оптических волокнах и передается в спектрометр для анализа.

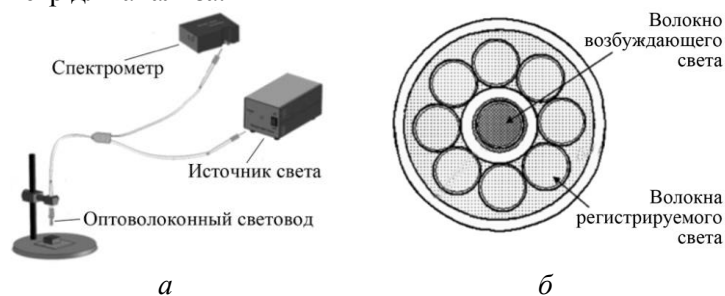


Рис. 3. Принципиальная схема установки (а) и сечение используемого оптоволоконного световода (б)

Распределение Темпорфина в мышцах-опухоленосителях. На рис. 3 представлены флуоресцентные псевдоцветные изображения мышей-опухоленосителей при введении Темпорфина, полученные с использованием техники поверхностного флуоресцентного имиджинга. Сравнение изображений, полученных на различных временных промежутках, показало, что процессы распределения Темпорфина в организме осуществляются медленно (более суток). Так, спустя 3 ч после внутривенного введения ФС наблюдается слабый уровень флуоресценции по всему телу животного, что, по всей видимости, связано с агрегацией молекул Темпорфина [6], а также циркуляцией основной доли ФС в кровотоке. С увеличением времени Темпорфин накапливается в опухоли и нормальных тканях, характеризующихся тропностью к ФС.

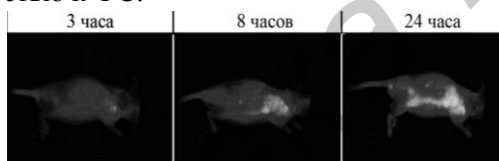


Рис. 4. Прижизненная флуоресценция Темпорфина в мышцах-опухоленосителях. Концентрация мТГФХ = 0,3 мг/кг.

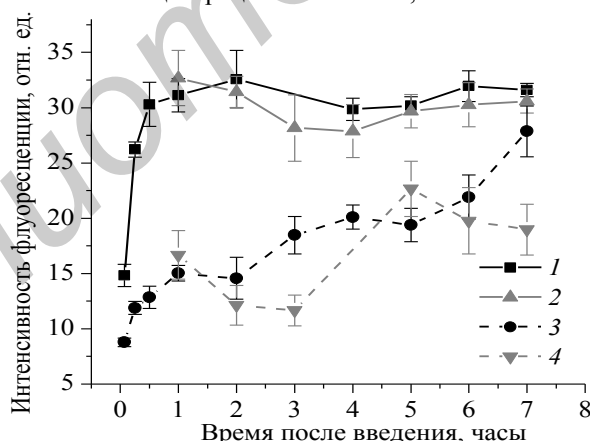


Рис. 5. Кинетика прижизненной флуоресценции Темпорфина в опухоли (1) и мышце бедра мышши-опухоленосителя (2). Концентрация Темпорфина = 0,3 мг/кг

Более детальное исследование кинетических процессов накопления Темпорфина в опухоли животного было проведено с использованием методики оптоволоконной спектрометрии [7]. На рис. 5 представлены кинетики прижизненной флуоресценции Темпорфина в опухоли и в мышце бедра мышши-опухоленосителя. При введении Темпорфина в чистом виде наблюдается медленная кинетика флуоресценции, и только спустя 8–10 ч интенсивность флуоресценции ФС в опухоли приближается к максимальной. Полученные различия, по всей видимости, отражают особенности агрегационного состояния ФС при его введении в организм.

Заключение

Проведенные исследования позволили сравнить возможности различных физико-химических методов для объективного контроля процессов распределения фотосенсибилизатора Темопорфин *in vivo*. Показано, что применение техник поверхностного флуоресцентного имиджинга и контактной оптоволоконной спектрометрии позволяют получать оперативную и наглядную информацию о процессах распределения ФС в тканях и организме *in vivo*. Однако данные методы обладают рядом недостатков: регистрируется мономерный Темопорфин (агрегаты не флуоресцируют), различия в квантовых выходах флуоресценции ФС при связывании с биологическими структурами существенно искажают картину распределения, а также низкая проникающая способность используемых методик не позволяет объективно оценить концентрации ФС в отдельных тканях и органах. В связи с этим предлагается сочетанное использование данных методов с методом химической экстракции ФС из тканей/органов.

FLUORESCENT APPROACHES FOR CONTROLLING OF PHOTOSENSITIZER DISTRIBUTION *IN VIVO*

I.V. YAKAVETS, I.V. YANKOVSKY, L.N. BOLOTINE, V.P. ZORIN

Abstract

Two approaches based on the live fluorescence to control the distribution of the photosensitizer are presented. Temoporfin is studied: the small animal imaging and fiber optic spectrometry technique. It was shown, that described fluorescent approaches allow one to obtain clear visual information about photosensitizer distribution processes in tissues and organism *in vivo*.

Keywords: photosensitizer, intravital fluorescence, photodynamic therapy.

Список литературы

1. *Kiesslich T.* // BioMed Res. Int. 2013. Vol. 5. P. 1–17.
2. *Niesner R.A., Hauser A.E.* // Cytometry. 2011. Vol. 79. P. 789–798.
3. *Senge M.O., Brandt J.C.* // Photochem. Photobiol. 2011. Vol. 87. P. 1240–1296.
4. *Weigert R.* // Histochem. Cell Biol. 2010. Vol. 133. P. 481–491.
5. *Haedicke* // Biomaterials. 2013. Vol. 34. P. 10075–10083.
6. *Jones H.J., Vernon D.I., Brown S.B. et al.* // British journal of cancer. 2003. Vol. 89. P. 398–404.
7. *Yankovsky I.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2016. Vol. 91. P. 172–182.

УДК 615.47 : 004.942

МОДЕЛИРОВАНИЕ КАВИТАЦИИ В ПРОБАХ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАЗВУКОВЫМИ КОЛЕБАНИЯМИ

П.В. КАМЛЯЧ

Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
П. Бровка, 6, Минск, 220013, Беларусь

Поступила в редакцию 15 ноября 2016

Построена модель определения докавитационных порогов ультразвука, позволяющая вычислять предельные значения амплитуды и частоты ультразвука, при которых не наблюдается нестационарная кавитация.

Ключевые слова: ультразвук, кавитация, модель, пробы крови, медицина.