

ИССЛЕДОВАНИЕ АУТОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ И ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ «ФОТОДИТАЗИНА» В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ВВЕДЕНИЯ

©2013 Ю.О.Кузнецова¹, А.С. Саидов², Н.А. Калягина³ Е. И. Брехов², Д. М. Ягудаев²

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Москва

²Учебно-научный медицинский центр Управления делами Президента РФ, г. Москва

³Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, г. Москва

Поступила в редакцию 26.11.2013

В данной работе представлен спектральный анализ особенностей диффузного отражения органов и флуоресценции фотосенсибилизатора «Фотодитазин» в органах мышей, в соответствии с их оптическими свойствами. Для этого, сначала были изучены особенности поглощения, рассеяния и аутофлуоресценции, а затем проведено исследование динамики накопления фотосенсибилизатора в органах мыши в зависимости от времени. Для каждого исследуемого органа мыши и для каждой временной точки были разработаны алгоритмы анализа и обработки данных, позволяющие избежать интерпретационных ошибок.

Ключевые слова: аутофлуоресценция, флуоресценция, рассеяние и поглощение

1. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день существует несколько методов для отслеживания движения и накопления препаратов в органах. Самыми известными из них являются радиоизотопная диагностика, рентгенологическое исследование, и высокоэффективная жидкостная хроматография [1, 2, 3]. Однако, помимо наличия недостатков, связанных с использованием радиоактивных соединений, рентгеновского аппарата [1] и йодистых препаратов [2], эти методы не позволяют сделать комплексной и количественной оценки препаратов во всех органах. Методы оценки/детектирования флуоресценции, в свою очередь, способны визуализировать и количественно оценивать содержание препаратов-красителей в организме. Поэтому, целью нашей работы является разработка алгоритма анализа динамики накопления препаратов в организме с помощью флуоресцентного анализа. Для достижения данной цели мы проведем спектральный анализ органов мыши до и после введения флуоресцентного маркера - фотосенсибилизатора (ФС), проследив, таким образом, динамику накопления препарата в за-

висимости от времени. При разработке алгоритма анализа полученных спектральных данных будут учтены различия в поглощении, рассеянии и аутофлуоресценции исследуемых тканей.

Несмотря на то, что в медицинской практике лимфотропное введение препарата применяется уже более 320 лет [4], все еще остаются не изученным характер распределения препаратов в различных органах, расположенных в лимфо-зоне и на расстоянии от нее. Поэтому, разработанный алгоритм будет апробирован на примере анализа распределения ФС в организме мышей при сравнении двух методов введения: внутривенном и лимфотропном. Акцент такого исследования будет сделан на паховой области, поскольку в настоящее время в клинической медицине проблема лечения воспаления яичек остается актуальной и, по данным авторов [5, 6, 7], пациенты с острыми воспалительными заболеваниями яичка и его придатка составляют до 10,2 % в структуре экстренных урологических заболеваний. Однако стоит также обратить внимание на распределение препарата и в паренхиматозных органах, таких как печень, почки и селезенка, т.к. они участвуют в кроветворении и являются естественными фильтрами организма.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения эксперимента в качестве биологических моделей были взяты белые лабораторные мыши, а в качестве фотосенсибилизатора – «Фотодитазин». ФС вводился в организм мыши двумя способами: лимфотропно и внутривенно. При лимфотропном методе инъекция «Фотодитазина» производилась подкожно, в паховую зону (слева) - в область скопления лимфотических со-

Кузнецова Юлия Олеговна, студентка, 6 курс.

E-mail: JOKuznetsova@mail.ru

Саидов Аюбджон Саймуродович, аспирант, 1 курс.

E-mail: odatov@list.ru

Калягина Нина Анатольевна, кандидат физико-математических наук, инженер. E-mail: nina.kalyagina@gmail.com

Евгений Иванович Брехов, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургии с курсами эндоскопии и урологии. E-mail: drbrehov@mail.ru

Ягудаев Даниэль Меерович, доктор медицинских наук, доцент кафедры хирургии с курсами эндоскопии и урологии. E-mail: y.d.m.21@mail.ru

судов, а при внутривенном методе - в хвостовую вену мыши в концентрации 5 мг/кг в объеме 20 мкл/мышь. В качестве источника излучения для передачи излучения к исследуемым органам и возбуждения флюоресценции использовался He-Ne лазер с длиной волны 632,8 нм и выходной мощностью из торца волокна 5 мВт. Детектирование сигнала осуществлялось с помощью лазерного спектроанализатора «LESA-01-BIOSPEC» посредством волоконно-оптического зонда [8]. При измерениях зонд находился «в контакте» с тканями мыши. Сначала проводились измерения спектров диффузного отражения и аутофлюоресценции различных органов мышей, а затем оценивалось накопление препарата в промежутки времени между 15-ой минутой и 24-мя часами.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После преобразования и обработки сигнала посредством лазерного спектроанализатора «LESA-01-BIOSPEC», были получены спектрограммы от различных участков органов мышей. При измерениях без введенного ФС в организм мыши, спектрограммы представляли собой кривые с одним выраженным пиком (диффузного отражения), отвечающим за рассеяние и поглощение лазерного излучения (пик слева в диапазоне 625-642 нм), и небольшим подъемом, отвечающим за аутофлюоресценцию органов (пик справа в диапазоне 642-810 нм) (рис.1). Для пика диффузного отражения (в области длины волны излучения) было характерно более сильное поглощение почками и печенью по сравнению с поглощением яичком. Это связано с тем, что кровенаполненность этих органов выше и гемоглобин, содержащийся в этих органах, поглощает в данном диапазоне длин волн [9]. При измерениях с введенным ФС, спектрограммы представляли собой кривые с двумя выраженными пиками: одним - отвечающим за рассеяние и поглощение (пик слева) и другим - отвечающим за флюоресценцию препарата (пик справа) (рис. 2).

Спектральные данные анализировались в ограниченных диапазонах, в пределах которых оценивались рассеяние, поглощение, аутофлюоресценция и флюоресценция, обусловленная ФС, а также определялись границы данных диапазонов (посредством расстановки «маркеров»). Маркер М1 (красный) был поставлен на первый пик нашего спектра (отвечающий за рассеяние и поглощение, (рис. 1)). Маркеры М2 и М3 (синий и зеленый) были размещены таким образом, чтобы площадь, заключенная между этими маркерами и спектром флюоресценции не включала в себя часть спектра, соответствующую шумам. Границы диапазонов были выбраны индивидуально для каждого из органов и тканей, согласно их оптическим свойствам.

Для яичка маркеры были распределены следующим образом (по длинам волн): М1=632.82 нм, М2=646.15 нм и М3=793 нм. Далее к спектрограммам была применена функция (P2_3)/M1, позволяющая получить соотношение площади под кривой флюоресценции (P2_3) к соответствующему пику обратного рассеяния (M1). Если спектрограммы находились на разных уровнях относительно оси абсцисс, то, во избежание ошибок в вычислениях, они были приведены к одному уровню.

После обработки сигналов были выбраны спектрограммы, имеющие максимальное значе-

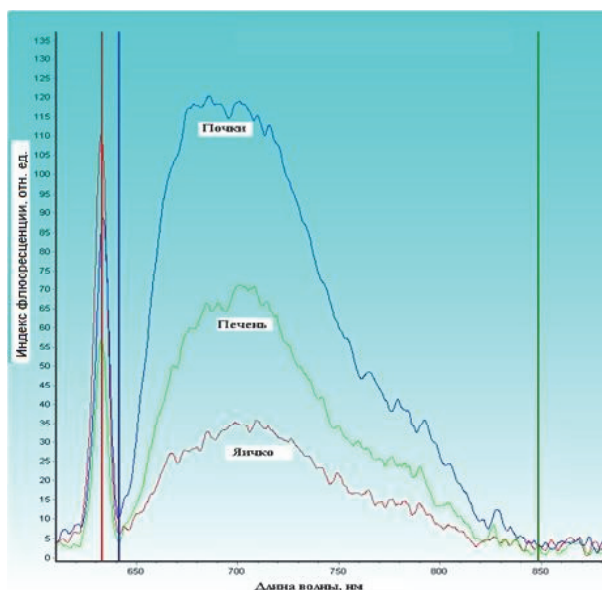


Рис. 1. Пример спектров поглощения, обратного рассеяния и аутофлюоресценции яичка, печени и почек

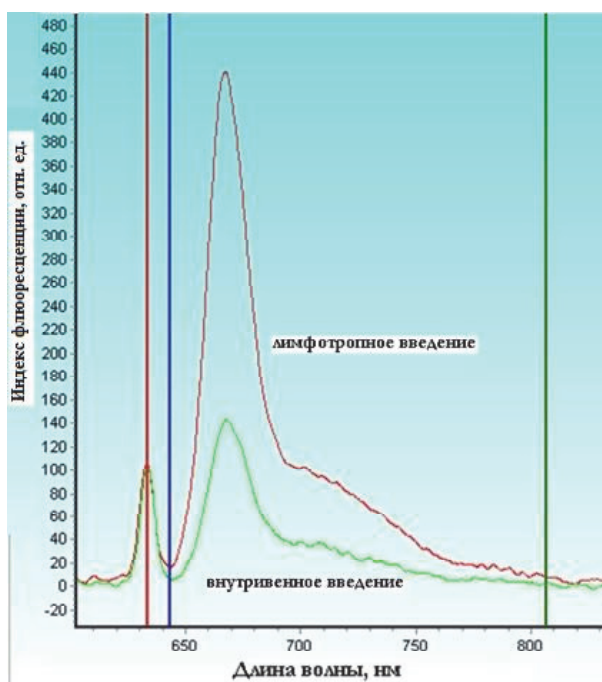


Рис. 2. Пример детектирования различий в флюоресцентных сигналах при различных способах введения (в яичках, на 60 мин)

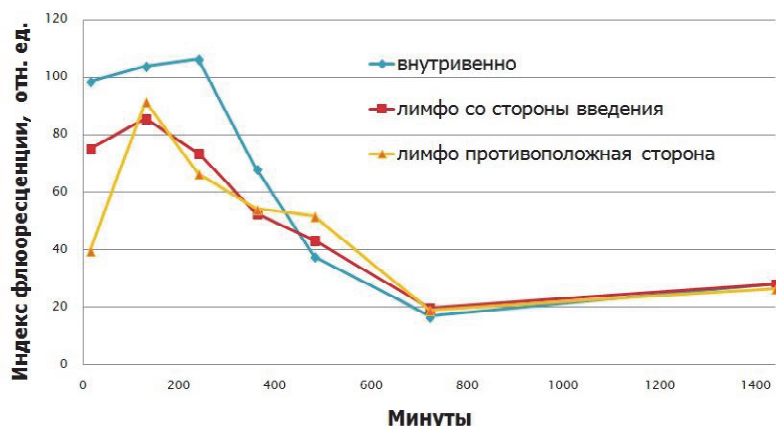


Рис. 3. График зависимости индекса флюоресценции ФС от времени для яичек

ние индекса флюоресценции (интенсивности флюоресценции) для каждого органа и исследуемой временной точки. На основе полученных данных были получены зависимости интенсивности флюоресценции от времени для яичка, печени и почек (рис. 3, 4 и 5).

На первых минутах при лимфотропном введении наблюдается избирательное накопление препарата в яичке, находящемся на стороне места введения по сравнению с противоположенным (рис. 3). В связи с медленным оттоком ФС из места лимфотропного введения, в первые часы (15мин-6 часов) накопление Фотодитазина при внутривенном введении выше, чем при лимфотропном. С течением времени наблюдается увеличение содержания препарата при лимфотропном введении по сравнению с внутривенным (рис. 3). Также было выявлено, что при внутривенном введении накопление ФС происходит до 240 мин, а затем преобладает его постепенное выведение из органа. В то время как при лимфотропном способе препарат удерживается вплоть до 480 мин, что говорит о более пролонгированном нахождении ФС при данном способе введения. Протекание данного процесса также связано с тем, что “Фотодитазин” постепенно поступает из места

введения препарата и подпитывает лимфатическую систему. После временной точки в 12 часов концентрация препарата в яичке уменьшается и графики, отвечающие обоим способам введения, устремляются в одну точку.

При внутривенном введении содержание ФС в печени и почках достигает своего максимума (рис. 4 и 5) намного быстрее, чем в яичках, а при лимфотропном его содержание остается намного ниже до тех пор, пока они не сойдутся в одну точку (к 240-360 мин соответственно). Однако, в почках после 360 мин наблюдается более высокое содержание препарата при лимфотропном введении по сравнению с внутривенным.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили определить наиболее эффективный алгоритм обработки и анализа спектральных данных различных органов и тканей (содержащих и не содержащих ФС), благодаря которому, предоставляется возможным отслеживание накопления препарата в органах в зависимости от времени, избегая интерпретационных ошибок.

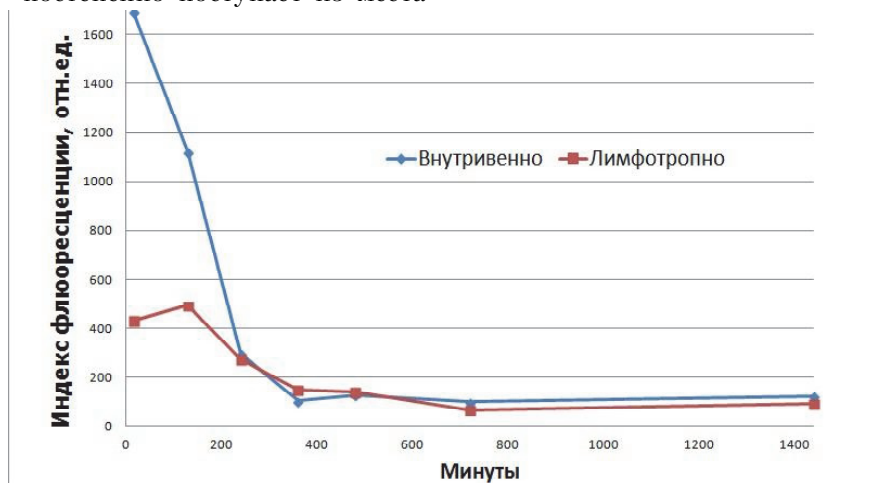


Рис. 4. График зависимости интенсивности флюоресценции ФС от времени для печени

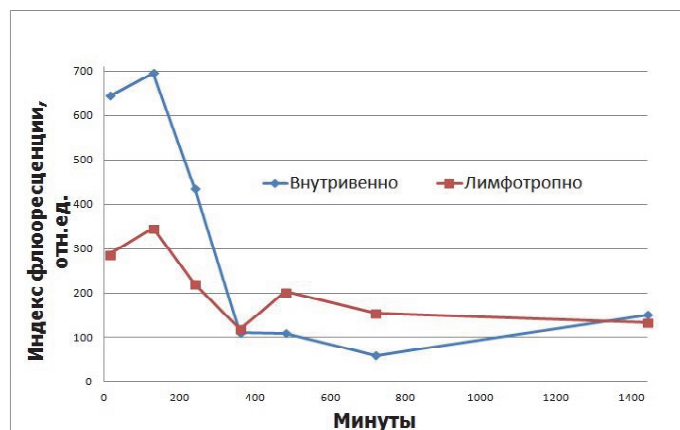


Рис. 5. График зависимости интенсивности флюоресценции ФС от времени для почек

Полученные результаты апробации данного алгоритма показывают, что лимфотропный метод введения может потенциально повысить эффективность лечения, т.е. снизить гепато-, нефротоксичность, т.к. на определенных временных промежутках накопление препарата в печени и почках заметно ниже. Однако, для подтверждения этого, требуется провести дальнейшие исследования на мышах с воспалением и новообразованиями, в т.ч. с целью выявления наиболее эффективных и минимально токсичных методов воздействия препаратов на ткани и органы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Важенин А.В., Яйцев С.В., Васильева Е.Б., Сырчинова Е.А.* Радионуклидная диагностика и терапия как со-
временное перспективное направление развития ядерной медицины на Южном Урале // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012 № 2. С.123.
2. *Aichinger H.* Radiation exposure and image quality in x-ray diagnostic radiology: physical principles and clinical applications. Springer, 2012.
3. *Хенке Х.* Жидкостная хроматография. Litres, 2013.
4. *Левин Ю.М., Ионов П.К., Косякова Н.И.* Лимфотропное введение лекарственных препаратов: средства и методы практической лимфологии. Москва, 1987.
5. *Сафаров Ш.А.* Современные подходы к лечению острого эпидидимоорхита. Дисс. ... канд. мед.наук. М. 2007.
6. *Корюков Д.В.* Современные аспекты диагностики и лечения острого неспецифического эпидидимоорхита. Дисс. ... канд. мед. Наук. 2010.
7. *Белый Л.Е.* Острый эпидидимит: этиология, патогенез, диагностика и лечение // Урология. 2010. № 2.
8. *Loschenov V.B., Konov V.I., and Prokhorov A.M.* Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostics // Laser Physics, 2000. 10. No. 6. Pp. 1188–1207.
9. *Рогаткин Д.А.* Физические основы оптической оксиметрии // Медицинская физика. 2012 № 2. С. 97-114.

RESEARCH OF AUTOFLUORESCENCE AND FLUORESCENCE OF “PHOTODITAZIN” IN ORGANS OF MICE WITH DIFFERENT METHODS OF INJECTION

© 2013 J.O. Kuznetsova¹, A.S. Saidov², N.A. Kalyagina³, E.I. Brehov², D.M. Yagudaev²

¹National Research Nuclear University “MEPhI”, Moscow

²Teaching and Research Medical Center,

Administrative Department of the President of the Russian Federation, Moscow

³A.M. Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow

This work presents an analysis of the spectral features of diffuse reflectance and fluorescence of photosensitizer “Photoditazine” in the organs of mice in accordance with their optical properties. For that purpose first of all the characteristics of the absorption, scattering and autofluorescence was studied and then the dynamic of accumulation of the photosensitizer in the organs of mice was investigated, depending on the time. For each investigated organ of mouse and for each time point the algorithms for the analyzing and processing of data allowing for avoiding interpretation errors were developed.

Keywords: autofluorescence, fluorescence, scattering and absorption

Julia Kuznetsova, Student, 6 year.

E-mail: JOKuznetsova@mail.ru

Ayubdzhon Saidov, Graduate Student, 1 year.

E-mail: odamov@list.ru

Nina Kalyagina, Candidate of Physics and Mathematics, Engineer. E-mail: nina.kalyagina@gmail.com

Eugene Brehov, Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Surgery with the course of Endoscopy and Urology. E-mail: drbrehov@mail.ru

Daniel Yagudaev, Doctor of Medicine, Associate Professor of Department of Surgery with the Course of Endoscopy and Urology. E-mail: y.d.m.21@mail.ru