

УДК 535.371

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ В ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ IN VIVO

Д.С. ТАРАСОВ<sup>1</sup>, М.П. САМЦОВ<sup>1</sup>, Н.И. КАЗАЧКИНА<sup>2</sup>, А.П. САВИЦКИЙ<sup>2</sup>, В.В. ЖЕРДЕВА<sup>2</sup>,  
А.О. САВИН<sup>3</sup>, Р.Д. ЗИЛЬБЕРМАН<sup>3</sup>, В.М. НАСЕК<sup>3</sup>, П.Т. ПЕТРОВ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Российская Федерация

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Республики Беларусь, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 9 ноября 2018

**Аннотация.** С помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000 (Perkin Elmer, США) исследовано распределение фотосенсибилизатора на основе индоотрикарбоцианинового красителя в тканях лабораторных животных in vivo. Зарегистрированы флуоресцентные 3D изображения мышей Nu/Nu с перевивными опухолями на разных временных отсчетах после внутривенного введения индоотрикарбоцианинового красителя. Определена фармакокинетика индоотрикарбоцианинового красителя при концентрации 1 мг/кг. Установлено, что через 40–60 мин после внутривенного введения концентрация красителя в тканях выходит на квазистационарное значение.

**Ключевые слова:** полиметиновые красители, фотосенсибилизаторы, фармакокинетика, диффузионная флуоресцентная томография.

**Abstract.** The photosensitizer based on indotricarbocyanine dye distribution in the laboratory animals tissues in vivo have been studied by diffusion fluorescent tomography with FMT 4000 (Perkin Elmer, USA). Nu/Nu mice with tumors fluorescent 3D images were recorded at different time after intravenous introduction of the indotricarbocyanine dye. The indotricarbocyanine dye pharmacokinetics was determined at concentration of 1 mg/kg. It was established that 40–60 minutes after intravenous introduction dye quasistationary value of concentration in the tissues reaches.

**Keywords:** polymethine dyes, photosensitizers, pharmacokinetics, diffusion fluorescence tomography.

**Doklady BGUIR. 2018, Vol. 117, No. 7, pp. 69-73**

**Distribution of photosensitizer based on indotricarbocyanine dye in the animal tissues in vivo**

**D.S. Tarasov, M.P. Samtsov, N.I. Kazachkina, A.P. Savitsky, V.V. Zherdeva, A.O. Savin,  
R.D. Zilberman, V.M. Nasek, P.T. Petrov**

### Введение

Диффузионная флуоресцентная томография (ДФТ) является перспективным методом оптической диагностики распределения биоиндикаторов различного назначения в организме подопытных животных in vivo. Данный метод позволяет получать 3D изображения органов лабораторных животных с учетом их индивидуальных особенностей. ДФТ позволяет реконструировать распределение флуорофора в тканях в трехмерном виде путем получения ряда проекций объекта исследования. Несомненный интерес представляет возможность регистрации по флуоресценции изменения концентрации фотосенсибилизаторов

при фотодинамической терапии, исследовать распределение фотосенсибилизатора (ФС) в органах и тканях *in vivo*. Кинетическая 3D-визуализация распределения трикарбоцианиновых инфракрасных ФС у мышей позволяет получать информацию для подбора оптимальных условий, повышающих эффективность проведения сеансов фотодинамической терапии. В данной работе приведены результаты исследования распределения ФС *in vivo* с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000 (Perkin Elmer, США).

### Методика

Объектом исследования выступал разработанный в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ симметричный индотрикарбоцианиновый краситель, который продемонстрировал хорошую фототоксичность в экспериментах с лабораторными животными [1]. Структурная формула приведена на рисунке 1.

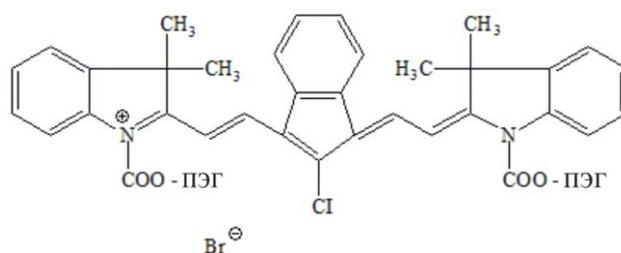


Рис. 1. Структурная формула индотрикарбоцианинового красителя

Эксперименты *in vivo* проводились на BCF1, самки (C57Bl/6JxСВА), а также на мышах Nu/Nu. Опухоль – LLC (Lewis lung cancer – мышьяная карцинома легких Льюис) – прививалась по 3 млн клеток/мышь подкожно в правую подлопаточную область. Внутривенное введение фотосенсибилизатора животным осуществлялось в 5 % глюкозе в концентрации 5 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1 мг/кг, 0,5 мг/кг.

Исследования распределения красителя по тканям проводилось с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000. В этом томографе обеспечивается возможность использования четырех каналов регистрации флуоресценции в спектральных областях 650–670, 690–740, 770–800 и 805+ нм при возбуждении излучением лазерных диодов с длиной волны 635, 670, 745 и 790 нм, соответственно. Выделение регистрируемого спектрального диапазона излучения осуществляется светофильтрами, в качестве фотодетектора использована высокочувствительная охлаждаемая CCD-камера. Распределение флуоресцирующего зонда в исследуемом объекте в томографе отображается с помощью цветовой шкалы. Значениям на цветовой шкале соответствуют объемная молярная концентрация флуоресцентного зонда. Для новых флуорофоров перед сканированием биологических объектов предусмотрено проведение операции калибровки томографа путем регистрации флуоресценции флуорофора с известной концентрацией раствора, помещенного в фантом. Фантом имеет идентичные исследуемым образцам геометрические параметры. Для максимального приближения оптических свойств фантома к исследуемым объектам в качестве материала, из которого он изготовлен, использована рассеивающая полимерная матрица. Для введения в фантом раствора флуорофора предусмотрен цилиндрический канал высотой 2 см, объемом 100 мкл.

### Результаты и их обсуждение

В работе [2] была показана возможность регистрации флуоресценции ФС на основе трикарбоцианинового красителя с помощью флуоресцентного диффузионного томографа, а также установлены условия для обеспечения корректного определения концентрации ФС в органах и тканях мышей Nu/Nu *in vivo*. Наибольший интерес представляет регистрация распределения ФС в органах и фармакокинетики ФС *in vivo* при терапевтических концентрациях 5–15 мг/кг. Несомненно, данные по концентрации, полученные из опухоли, имеют ценность как сами по себе, так и в сопоставлении с концентрацией в других органах

и тканях, в том числе и в здоровой мышечной ткани. Для этого перевивать опухоль необходимо таким образом, чтобы обеспечить одновременную регистрацию сигнала флуоресценции от опухоли и других интересующих областей за одно сканирование. Это удается обеспечить при расположении опухоли на спине. Флуоресцентные изображения, полученные при терапевтических концентрациях, оказались трудно разрешимыми на фоне интенсивного сигнала от печени. Отделить сигнал флуоресценции ФС удалось при снижении концентрации ФС до значений 0,5–1,0 мг/кг. На рис. 2 приведены изображения распределения индотрикарбоданинового красителя по телу мыши Nu/Nu для разных времен после внутривенного введения при концентрации красителя 1 мг/кг.

Программное обеспечение предоставляет комплекс инструментов для последующего анализа распределения флуорофора в органах и тканях. Наибольшее значение имеют инструменты из группы ROI (Region of interest, область интереса), которые позволяют выделять интересующую область с помощью одного из стандартных контуров и осуществлять измерение ряда количественных параметров. Знание об анатомических особенностях мышей в ряде случаев позволяет с высокой точностью идентифицировать органы и ткани на изображениях. Наилучшим образом поддается идентификации печень, в меньшей степени – кишечник, почки, опухоль.

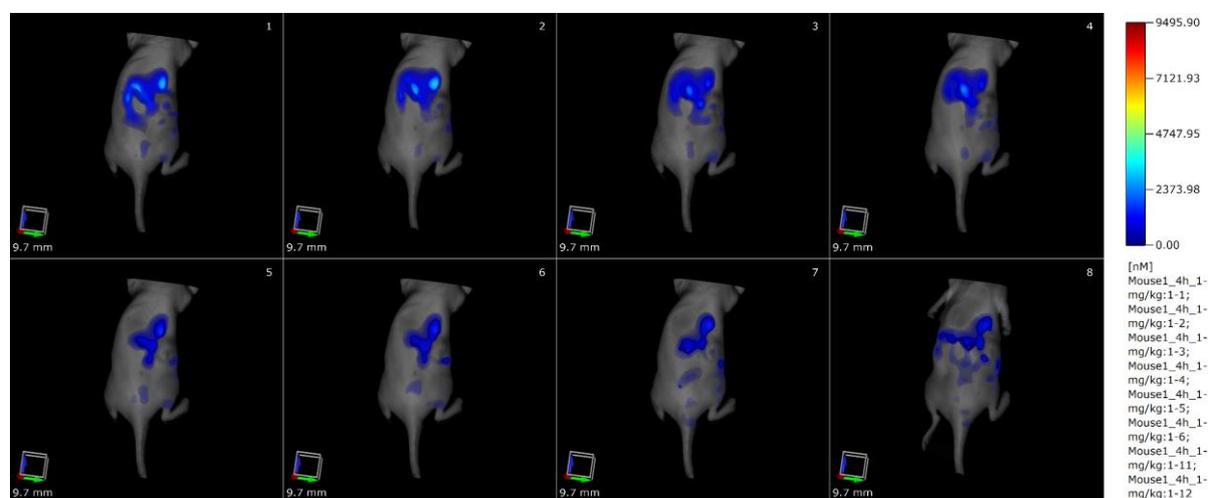


Рис. 2. Распределение индотрикарбоданинового красителя по телу мыши Nu/Nu от времени после введения (1 мг/кг): 1 – 12 мин; 2 – 18 мин; 3 – 23 мин; 4 – 30 мин; 5 – 50 мин; 6 – 58 мин; 7 – 124 мин; 8 – 186 мин

При определении концентрации красителя в представляющих интерес органах и тканях важное значение имеет такой параметр, как пороговое значение, которое характеризует сигнал флуоресценции введенного флуорофора в соседних тканях. В соответствии с данным параметром определяются внешние контуры объектов, которые будут учитываться при расчете суммарного количества и средней по объему концентрации красителя. Согласно рекомендациям в инструкции к программному обеспечению томографа, пороговый уровень устанавливается в соответствии с интенсивностью сигнала флуоресценции в тканях, которые окружают область интереса. Так, для опухоли пороговый уровень выбирается по концентрации красителя в здоровой мышечной ткани. Концентрация красителя также определяется посредством инструмента выделения области интереса.

На рис. 3 приведены значения средней концентрации красителя в печени, опухолевой и здоровой мышечных тканях Nu/Nu мыши *in vivo* от времени после введения, измеренная с помощью томографа.

В результате измерений определена фармакокинетика распределения красителя в печени, опухолевой и здоровой мышечных тканях *in vivo*. Установлено, что после внутривенного введения в течение первого часа происходит накопление ФС в опухолевом узле, при этом сохраняется достаточно высокая концентрация ФС в крови. Так, через 40 мин после введения концентрация ФС выходит на уровень, который затем практически постоянен на протяжении 60–80 мин (500–600 нМ). Концентрация ФС в здоровых мышечных тканях на всем

временном интервале наблюдения не превышала 200 нМ, что определило выбор этого значения в качестве порогового уровня.

В первые 10–20 мин после внутривенного введения препарата наблюдается высокая концентрации красителя в печени, при этом в течение 40–60 мин происходит монотонное ее снижение. По всей видимости, за 40–60 мин концентрация ФС в крови и в тканях достигает значений, при которых прекращается его накопление в тканях и начинается выведение обратно в кровь, что поддерживает квазистационарное значение в течение следующих 60–80 мин. Кажется разумным предположение, что выведение красителя из организма происходит через печень и желчный пузырь.

Следует отметить, что индекс контрастности, отношение интенсивностей флуоресценции в опухолевой и здоровой мышечных тканях, достигает 3 во временном интервале, когда сохраняется постоянная концентрация красителя в тканях.

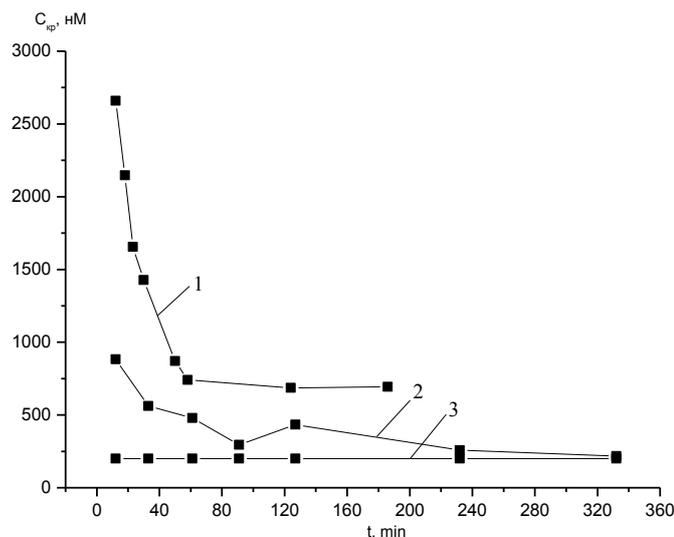


Рис. 3. Средняя концентрация красителя в печени (1), опухолевой (2) и здоровой мышечных тканях (3) мышей Nu/Nu *in vivo* от времени после введения, измеренная на томографе с помощью ROI (концентрация красителя – 1 мг/кг)

### Заключение

Таким образом, с помощью диффузионного флуоресцентного томографа FMT 4000 (Perkin Elmer, США) исследовано распределение фотосенсибилизатора на основе индотрикарбоцианинового красителя в тканях лабораторных животных *in vivo*. Зарегистрированы флуоресцентные 3D изображения мышей Nu/Nu с перевивными опухолями на разных временных отсчетах после внутривенного введения индотрикарбоцианинового красителя. Зарегистрирована фармакокинетика индотрикарбоцианинового красителя при концентрации 1 мг/кг. Установлено, что через 40–60 мин после введения концентрация красителя в тканях выходит на квазистационарное значение.

### Список литературы

1. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A.A. Lugovski [et al.] // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2016. Vol. 316. P. 31–36.
2. Оптимизация параметров фантома для диффузионной флуоресцентной томографии биотканей *in vivo* / М.П. Самцов [и др.] // J. of the Belarusian State University. Physics. 2018. № 1. С. 33–40

### References

1. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A.A. Lugovski [et al.] // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2016. Vol. 316. P. 31–36.
2. Optimizacija parametrov fantoma dlja diffuzionnoj fluorescentnoj tomografii biotkaney *in vivo* / M.P. Samtsov [et al.] // J. of the Belarusian State University. Physics. 2018. № 1. S. 33–40. (in Russ.)

### **Сведения об авторах**

Тарасов Д.С., н.с. лаборатории спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ.

Самцов М.П., д.ф.-м.н, доцент, заведующий лабораторией спектроскопии НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ.

Казачкина Н.И., к.б.н., с.н.с. Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Савицкий А.П., д.х.н., профессор, заместитель директора Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Жердева В.В., к.б.н., с.н.с. Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

### **Адрес для корреспонденции**

220045, Республика Беларусь  
г. Минск, ул. Курчатова, 7  
НИИ прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко БГУ  
тел. +375-17-212-41-44;  
e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru  
Тарасов Дмитрий Сергеевич

### **Information about the authors**

Tarasov D.S., researcher of Institute for applied physical problems named after A.N. Sevchenko of BSU.

Samtsov M.P., D.Sci, head of the spectroscopy Laboratory of Institute for applied physical problems named after A.N. Sevchenko of BSU.

Kazachkina N.I., PhD, senior researcher of Institute of biochemistry named after A.N. Bach of Federal research center «Fundamentals of biotechnology» of Russian academy of sciences.

Savitsky A.P., D.Sci, professor, deputy director of Institute of biochemistry named after A.N. Bach of the Federal research centre «Fundamentals of biotechnology» of Russian academy of sciences.

Zherdeva V.V., PhD, senior researcher of Institute of biochemistry named after A.N. Bach of Federal research center «Fundamentals of biotechnology» of Russian academy of sciences.

### **Address for correspondence**

220045, Republic of Belarus  
Minsk, Kyrchatov str., 7,  
Institute for applied physical problems  
named after A.N. Sevchenko of BSU  
tel. +375-17-212-41-44;  
e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru  
Tarasau Dzmitry Sergeevich