

низкоинтенсивной лазерной терапии // Биотехносфера. – 2009. – № 6. – С. 40-44.

3. Rogatkin D.A., Dunaev A.V. Stimulation of Blood Microcirculation at Low Level Laser Therapy: Monitoring Tools and Preliminary Data // Journal of Medical Research and Development (JMRD). – 2014. – Т. 3. - № 1. – P. 100-106.

УДК 535.372

ВЕРИФИКАЦИЯ КАНАЛА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ИНГИБИТОРА

К.Ю. Кандурова, В.В. Шуплецов, Е.В. Потапова

Научно-технологический центр биомедицинской фотоники,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел

Проведены измерения спектров флуоресценции печени лабораторной крысы in vivo при воздействии на ткани митохондриальным ингибитором. Наблюдались изменения интенсивности флуоресценции, свидетельствующие о чувствительности разработанного канала флуоресцентной спектроскопии к изменениям метаболизма клеток.

Ключевые слова: оптическая биопсия, флуоресцентная спектроскопия.

FLUORESCENCE SPECTROSCOPY CHANNEL VERIFICATION WITH MITOCHONDRIAL INHIBITOR APPLICATION

K.Y. Kandurova, V.V. Shupletsov, E.V. Potapova

Research and Development Center of Biomedical Photonics,
Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel

Fluorescence spectra of laboratory rats' liver were recorded in vivo under the influence of mitochondrial inhibitor on tissues. Changes in fluorescence intensity were observed, indicating the sensitivity of the developed fluorescence spectroscopy channel to changes in cell metabolism.

Key words: optical biopsy, fluorescence spectroscopy.

В настоящее время оптическая биопсия находит все более широкое применение в биомедицинских исследованиях. Особый интерес для внедрения данных методов демонстрирует миниинвазивная абдоминальная хирургия. Оптическая биопсия может служить инструментом для получения дополнительной диагностической информации в режиме реального времени, что позволит ускорить процесс лечения и повысить его эффективность [1].

Одним из перспективных методов является флуоресцентная спектроскопия (ФС). Данный метод основан на регистрации флуоресценции эндогенных флуорофоров при зондировании биологической ткани монохроматическим излучением и анализе различий в спектральном составе

флуоресценции в норме и патологии. В частности, метод ФС позволяет оценивать метаболическую активность клеток по флуоресценции коферментов никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД). Концентрация этих веществ чувствительна к изменениям митохондриального метаболизма, что может быть зарегистрировано *in vivo* [2]. Однако, на спектры флуоресценции также оказывает влияние присутствие других флуорофоров (коллагена, эластина, порфирина, липофусцина и др.) По этой причине важно учитывать вклад коферментов в суммарный регистрируемый сигнал для более точной калибровки канала ФС и интерпретации результатов.

Таким образом, целью работы явилось проведение измерений с целью верификации канала ФС установки тонкоигольной оптической биопсии для оценки чувствительности к изменениям концентрации целевых флуорофоров.

Измерения проводились с помощью специально разработанного канала ФС с источниками 365 нм и 450 нм для возбуждения автофлуоресценции НАДН и ФАД. Для ослабления обратного рассеянного излучения использовались фильтры с длинами волн среза 400 нм и 495 нм. Спектры флуоресценции регистрировались с помощью ПЗС-спектрометра в диапазоне 350-1000 нм. Оптическое излучение доставлялось с помощью специально разработанного тонкоигольного (1 мм) волоконно-оптического зонда. Управление системой и обработка данных проводились в среде MATLAB.

Чтобы вызвать быстрые изменения метаболической активности, использовался ингибитор окислительного фосфорилирования карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (КЦХГ). КЦХГ повышает проницаемость митохондриальной мембраны, что стимулирует потребление кислорода и вызывает снижение содержания НАДН и увеличение содержания ФАД [3]. КЦХГ был растворен в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения концентраций 1 ммоль, 0,1 ммоль и 0,01 ммоль, что было связано с поиском оптимальной концентрации для тканей целого органа, т.к. большинство такого рода исследований проводятся на клетках *in vitro*. ДМСО, разведенный в натрий-фосфатном буферном растворе в концентрациях 1%, 10% и 100%, использовался для контрольных измерений.

Измерения проводились на клинически здоровых самцах крыс линии Вистар. Исследования были одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол заседания №12 от 6.09.2018) и проведены в соответствии с принципами GLP. Измерения проводились на поверхности печени в течение 1 минуты после нанесения ДМСО и после нанесения КЦХГ, а затем рассчитывалось относительное изменение интенсивности флуоресценции (таблица 1).

Таблица 1. Изменение интенсивности флуоресценции тканей печени

| Длина волны, нм | ДМСО | | | КЦХГ | | |
|-----------------|--------|--------|--------|------------|-----------|---------|
| | 1% | 10% | 100% | 0,01 ммоль | 0,1 ммоль | 1 ммоль |
| 365 | +1,9% | +7,9% | -26,4% | -1,9% | -22,4% | -* |
| 450 | -13,9% | -16,2% | -* | -10,6% | -* | +22,9% |

* измерения для данной концентрации не проводились

Отмечалось влияние раствора ДМСО при контрольных измерениях без КЦХГ. Изменения интенсивностей флуоресценции могут быть связаны как с наличием токсических свойств растворителя при определенных концентрациях, так и с эффектом фотообесцвечивания в случае снижения интенсивности флуоресценции при воздействии излучением длиной волны 450 нм.

После нанесения раствора КЦХГ, интенсивность флуоресценции, вызванной излучением 365 нм, снизилась по сравнению с контрольными измерениями. Флуоресценция от источника 450 нм снизилась в меньшей степени по сравнению с контролем при концентрации раствора 0,01 ммоль. При использовании раствора с концентрацией 1 ммоль наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции, что свидетельствует, что наблюдались последствия увеличения проницаемости митохондриальной мембраны.

Полученные данные показали способность разработанного канала регистрировать изменения интенсивности флуоресценции, вызванных непосредственно нарушениями митохондриального метаболизма, что необходимо для выявления патологических изменений в пределах одного органа. Была проверена возможность адаптации методики исследований клеточного метаболизма к измерениям в тканях целого органа *in vivo*. Перспективным представляется продолжение исследований для корректировки концентраций ДМСО и КЦХГ для более точной интерпретации данных с учетом особенностей тканей печени.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №18-15-00201.

Библиографический список

1. Интраоперационная лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия при экспериментальном панкреатите / Арутюнян А.В., Черданцев Д.В., Салмин В.В. и др. // Сибирское медицинское обозрение, 2012, 5, С. 20-24.
2. Тучин В.В. Оптическая медицинская диагностика: в 2 т. // В.В. Тучин – М.: Физматлит, 2007. Т. 1.
3. Weissig V., Edeas M. Mitochondrial Medicine. // V. Weissig, M. Edeas – Humana Press, 2015.