

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

УДК 57.085.1

©Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПРИЖИЗНЕННОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ *IN VIVO* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ХЛОРИНОВОГО РЯДА

С.В. Шляхтин^{1}, Т.В. Трухачева¹, Г.А. Исаков¹, Ю.П. Истомин²*

¹РУП “Белмедпрепараты”, Минск, 220007 Республика Беларусь, Минск,
Фабрициуса 30; тел.: +375 29 576 88 66; факс: +375 17 220 39 40;
эл. почта: S.Shlyakhtyn@rambler.ru

²ГУ “Республиканский Научно-практический Центр Онкологии и Медицинской
Радиологии им. Н.Н. Александрова”, Республика Беларусь, Минск

Разработана точная и воспроизводимая методика количественного определения фотосенсибилизатора (ФС) Фотолон в образцах печени лабораторных животных спектрофотометрическим методом с предварительной экстракцией. Подобраны и обоснованы условия экстракции исследуемого ФС. Для использованной методики количественного определения ФС Фотолон методом спектрометрии изучены основные аналитические характеристики. С использованием методики количественного определения ФС Фотолон в образцах ткани печени крыс спектрофотометрическим методом дана количественная оценка результатов измерения прижизненной флуоресценции ткани печени после введения ФС. Установлена высокая ($R=0,99$) степень корреляции результатов измерений, полученных методами спектрофотометрии *ex vivo* и спектрофлуориметрии *in vivo*. Показана пригодность метода прижизненного детектирования флуоресценции биологической ткани в условиях *in vivo* для проведения фармакокинетических исследований.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, хлорин е6, Фотолон, экстракция, флуоресценция, спектрофотометрия, фармакокинетика.

ВВЕДЕНИЕ. Метод фотодинамической терапии (ФДТ) в настоящее время является одним из многообещающих подходов в терапии злокачественных новообразований и ряда заболеваний неонкологической природы. В основу метода положена концепция о способности ряда веществ – фотосенсибилизаторов (ФС) – селективно накапливаться в патологических тканях и при воздействии света определенной длины волны инициировать образование высокоактивных частиц (в частности, молекул синглетного кислорода), оказывающих цитотоксический эффект. Механизмы цитотоксического действия ФДТ были детально показаны в работах Dougherty и соавт. [1]. Способность ФС концентрироваться преимущественно в патологических тканях, а также возможность локального облучения ткани-мишени низкоинтенсивным лазерным излучением позволяет направленно разрушать опухолевые и другие атипичные клетки и исключает возможность неконтролируемого повреждения прилежащих здоровых тканей.

Одной из актуальных проблем при исследовании новых ФС и метода ФДТ в целом является разработка и внедрение в исследовательскую практику надежных методов дозиметрии, обеспечивающих достоверное количественное определение концентраций ФС в биологических тканях в условиях *in vivo* [2]. Показано, что эффективность ФДТ зависит от концентрации ФС в патологической ткани

* - адресат для переписки

в момент её облучения светом [3]. Использование адекватных и простых, с технической точки зрения, методов количественного определения ФС в тканях позволит оптимизировать используемые клинические протоколы ФДТ опухолей различной локализации, повысить эффективность и безопасность проводимого лечения.

Традиционно, при исследовании распределения ФС в тканях внутренних органов используются инвазивные подходы, сопряженные с забором крови и/или биопсионного материала, химической экстракцией исследуемого вещества с его последующим количественным определением при помощи физико-химических методов, таких как спектрофотометрия [4], флуориметрия [5], хроматография [6], масс-спектрометрия [7]. Перечисленные выше методы являются высокоточными, обеспечивают возможность уверенного слежения за концентрацией ФС в исследуемой биологической ткани, однако представляются относительно трудоемкими, т.к. связаны с проведением большого количества манипуляций [8].

Указанных недостатков лишен метод, в основу которого положен принцип прижизненного детектирования флуоресценции ФС в тканях в условиях *in vivo*. В последнее время данный метод нашел широкое применение при изучении кинетики накопления и выведения ФС во внутренних органах [9]. В некоторых случаях возможен не только контроль изменения уровня ФС в органе-мишени, но и количественное определение концентрации сенсibilизатора в режиме реального времени. Так, в работе [10] было показано, что интенсивность флуоресценции фталоцианина алюминия в мышечной ткани и в печени крыс линейно зависит от концентрации ФС, определенной химическим методом, что позволяет рассчитать абсолютную концентрацию препарата. Однако, прямая пропорциональная зависимость между концентрацией ФС и флуоресценцией существует не всегда, поскольку как на возбуждение, так и на эмиссию флуоресценции влияет морфология и химический состав биологических тканей [11].

Целью настоящей работы являлось исследование возможности применения метода прижизненного детектирования флуоресценции *in vivo* для изучения фармакокинетики и биораспределения ФС на основе хлорина е6, а также оценка “надежности” использованной методики для определения в режиме реального времени концентрации ФС в биологической ткани.

МЕТОДИКА.

Фотосенсибилизатор.

В качестве ФС нами был использован препарат Фотолон, производства РУП “Белмедпрепараты” (Республика Беларусь). Фотолон представляет собой композицию тринатриевой соли хлорина е6 и низкомолекулярного поливинилпирролидона [12, 13]. Непосредственно перед введением экспериментальным животным Фотолон растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия до достижения необходимой концентрации по хлорину е6.

Модель исследования и экспериментальные животные.

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах обоего пола массой 150-200 г, которых содержали на стандартном пищевом и питьевом рационе. Все манипуляции на животных осуществляли после их введения в состояние нейролептаналгезии (раствор дроперидола и фентанила, 2:1, по 0,2 мл на 100 г массы тела, внутримышечно). Сразу после проведения анестезии животным внутривенно вводили исследуемый ФС в предусмотренных протоколом эксперимента дозах.

Для определения характера зависимости между интенсивностью прижизненной флуоресценции ткани печени крыс от концентрации исследуемого препарата было сформировано три группы экспериментальных животных по 3 особи в каждой. ФС вводили в/в, в хвостовую вену, в дозах 1,5 мг/кг (1-я группа), 5 мг/кг (2-я группа) и 15 мг/кг (3-я группа). Через 1 час после введения ФС животным проводили срединную лапаротомию и регистрировали интенсивность прижизненной флуоресценции ткани печени. Для каждого

животного в каждой группе проводили не менее 5 повторных измерений. После этого, экспериментальных животных декапитировали, забирали образцы ткани печени и проводили количественный анализ содержания препарата Фотолон спектрофотометрическим методом, по методике приведенной ниже.

При проведении фармакокинетических исследований по изучению динамики накопления и выведения ФС Фотолон в печени крыс было сформировано две группы животных по 16 особей в каждой. Животным первой группы вводили исследуемый ФС в дозе 5 мг/кг; животным второй группы – аналогичный объем 0,9% раствора хлорида натрия (плацебо). После введения раствора ФС или раствора плацебо животным проводили срединную лапаротомию. Прижизненное измерение уровня флуоресценции ткани печени осуществляли через 1-6 и 24 часа после введения Фотолон. После проведения измерений, часть животных в каждой группе декапитировали и производили забор образцов ткани печени. Образцы хранили при температуре не выше -20°C до проведения спектрофотометрического анализа количественного содержания исследуемого ФС.

Оборудование для проведения спектрофлуоресцентных и спектрофотометрических измерений.

Прижизненное детектирование уровня флуоресценции ткани осуществляли на лазерно-волоконном флуоресцентном спектроанализаторе “ЛЭСА 6” (БИОСПЕК, Россия) с гелий-неоновым диагностическим лазером ($\lambda_{\text{возб}} = 630$ нм, $\lambda_{\text{дет}} = 670$ нм). Средняя мощность возбуждающего излучения была 2 мВт, плотность энергии лазерного излучения в процессе одного обследования составляла не более 1 Дж/см². Регистрацию флуоресценции проводили под прямым углом к объекту, при легком касании ткани торцом оптоволоконного световода.

Спектры поглощения экстрактов записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC (Япония), используя кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий экстрагент.

Экстракция исследуемого ФС из биологической ткани и методика количественного определения.

Экстракцию ФС Фотолон из образцов ткани печени крыс осуществляли по следующей методике. Образцы ткани печени гомогенизировали в фарфоровой виае. К навеске полученного гомогената, массой 1 г, приливали 5 мл экстрагента, интенсивно встряхивали на вортекс-миксере Genius-3 (IKA WERKE, Германия) в течение 5 мин и центрифугировали 10 минут при 8000 g на центрифуге Biofuge Primo, оборудованной угловым ротором Highconic-Primo (Heraeus, Германия). Супернатант переносили в кювету спектрофотометра и регистрировали оптическую плотность раствора в диапазоне длин волн 250–750 нм. Количественное содержание ФС в ткани печени крыс рассчитывали по площади под длинноволновым пиком поглощения хлорина е6 при $\lambda = 662 \pm 2$ нм. Для проверки достоверности использованной спектрофотометрической методики были изучены следующие её аналитические характеристики: линейность, точность и воспроизводимость.

Для изучения специфичности и полноты экстракции были использованы модельные смеси, полученные следующим образом: к навескам гомогената ткани печени (массой 5 г каждая) интактных крыс приливали соответствующее количество раствора ФС Фотолон в 0,9% растворе хлорида натрия до достижения конечных концентраций ФС в смеси - 0,5 мкг/г; 15,5 мкг/г и 50 мкг/г. Полученные модельные смеси инкубировали в термостате при 37°C в течение 15 мин, после чего осуществляли жидкостную экстракцию ФС одним из экстрагентов по описанной выше методике.

Статистическая обработка полученных результатов.

Результаты измерений обрабатывали при помощи общепринятых методов параметрической и непараметрической статистики с использованием критериев Стьюдента, Манна-Уитни, а также методами дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Спектрофотометрическое определение количественного содержания ФС Фотолон в ткани печени крыс.

Для выявления корреляции между интенсивностью прижизненной флуоресценции биологической ткани и концентрацией в ней ФС необходимо использование достоверного арбитражного метода количественного определения ФС в биологических средах. В настоящей работе нами была использована собственная методика спектрофотометрического определения абсолютной концентрации ФС Фотолон (в пересчете на хлорин еб) в ткани печени крыс. В задачи исследования входила оценка возможностей и ограничений метода прижизненного детектирования флуоресценции биологической ткани *in vivo* при проведении фармакокинетического эксперимента. В качестве модели нами была выбрана ткань печени крыс, поскольку данный орган характеризуется наличием большого количества компонентов ретикуло-эндотелиальной системы, высокой перфузии и содержанием большого количества эндогенных порфиринов в гепатоцитах. Все перечисленные выше особенности ткани печени в значительной мере препятствуют достоверному определению концентраций экзогенных ФС в данном органе флуоресцентными методами [14], что позволяет установить возможности и ограничения метода прижизненного детектирования уровня флуоресценции тканей в условиях *in vivo*. Кроме того, известно, что в печени происходит эффективное накопление различных ФС, что позволяет использовать её в качестве аналога опухолевой ткани, также обладающей повышенным сродством к сенсibilизаторам [15].

При разработке методики спектрофотометрического определения количественного содержания ФС Фотолон в ткани печени крыс после его в/в введения нами была изучена селективность и полнота экстракции хлорина еб из биологической ткани при использовании в качестве экстрагентов следующих органических растворителей: i) смеси ацетон-аммиак (7:1, об/об); ii) метанола; iii) тритона X-100 (1% водный раствор); iv) смеси метанол-аммиак (9:1, об/об); v) смеси тритон X-100 (1%) – метанол (1:4, об/об). Соответствующие спектры поглощения полученных экстрактов приведены на рисунке 1.

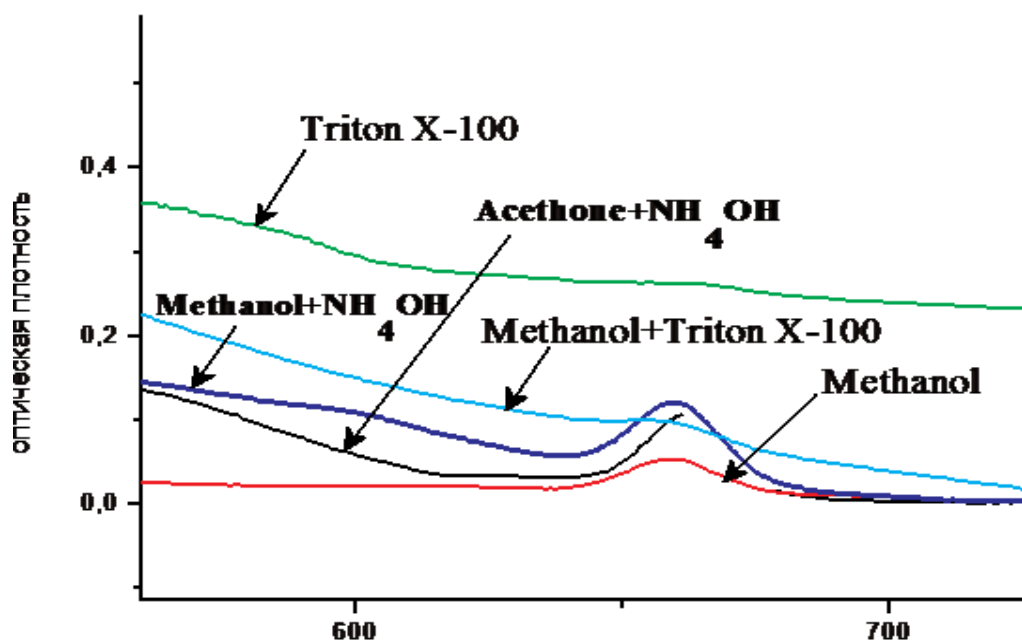


Рисунок 1.

Спектры поглощения экстрактов из ткани печени крыс, полученные с использованием: i) смеси ацетон-аммиак (7:1, об/об); ii) метанола; iii) тритона X-100 (1% водный раствор); iv) смеси метанол-аммиак (9:1, об/об); v) смеси тритон X-100 (1%) - метанол (1:4, об/об).

На спектрах поглощения экстрактов, полученных с использованием в качестве экстрагентов растворов тритона X-100 (1% водный раствор) и смеси тритон X-100 (1%) – метанол (1:4, об/об) отсутствуют характеристические максимумы в области 662 ± 5 нм, соответствующей наиболее специфичной полосе поглощения хлорина е6 (рис. 1). По всей видимости, это обусловлено сопутствующей экстракцией из ткани печени ряда соединений, интенсивно поглощающих в данной области спектра. Таким образом, экстракция с использованием 1% водного раствора тритона X-100 или комбинации тритон X-100 + метанол (1:4, об./об.) неспецифична и указанные экстрагенты не могут быть использованы для извлечения исследуемого ФС из биологических тканей. При использовании в качестве экстрагента смеси ацетон+аммиак (7:1, об/об), метанола или смеси метанол+аммиак (9:1, об/об) на спектрах полученных экстрактов присутствуют характеристические максимумы поглощения в области 662 ± 5 нм, соответствующие длинноволновой полосе поглощения хлорина е6 (рис. 1). Данные о полноте экстракции исследуемого ФС из ткани печени крыс при использовании указанных экстрагентов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Степень извлечения хлорина е6 из ткани печени крыс при использовании в качестве экстрагента различных органических растворителей.

Экстрагент	Приготовленная концентрация в ткани (по хлорину е6)	Измеренная концентрация, мкг/г	Степень извлечения (коэффициент экстракции, %)
метанол	14,56	4,41\pm0,68	30,3\pm4,6
ацетон+аммиак (7:1 об/об)	14,93	10,31\pm0,59	69,1\pm4,0
метанол+аммиак (9:1 об/об)	15,38	8,67\pm1,12	56,4\pm7,2

Наиболее эффективная экстракция ФС Фотолон (хлорина е6) из ткани печени крыс достигается при использовании в качестве экстрагента смеси ацетон + аммиак (7:1, об/об). В таблице 2 приведены результаты количественного определения содержания ФС Фотолон в полученных экстрактах из образцов ткани печени крыс с различным уровнем содержания исследуемого препарата (модельные смеси) и соответствующие значения коэффициента экстракции. Степень извлечения ФС Фотолон варьировала в пределах от 65% до 73%, причем полнота извлечения незначительно снижалась с уменьшением концентрации препарата в ткани. Средняя степень извлечения препарата при проведении экстракции из биологических тканей по описанной выше методике с использованием в качестве экстрагента смеси ацетон+аммиак (7:1, об/об) составила 71,6%.

Таблица 2. Степень извлечения препарата Фотолон (хлорина е6) из образцов ткани печени крыс с различным уровнем содержания исследуемого ФС

Уровень конц.	Приготовленная концентрация в ткани (по хлорину е6), мкг/г	Измеренная концентрация, мкг/г	Степень извлечения (коэффициент экстракции, %)
1	0,60	0,394 \pm 0,046	65,3 \pm 7,7
2	13,54	10,053 \pm 0,341	74,3 \pm 1,2
3	49,78	36,313 \pm 1,112	73,0 \pm 2,2

Специфичность экстракции подтверждается тем, что в спектре поглощения экстракта из ткани печени крыс, не содержащей ФС Фотолон, полосы поглощения в области 662 ± 5 нм, характерные для соединений хлориновой природы (в том числе, для хлорина е6) отсутствуют (рис. 2).

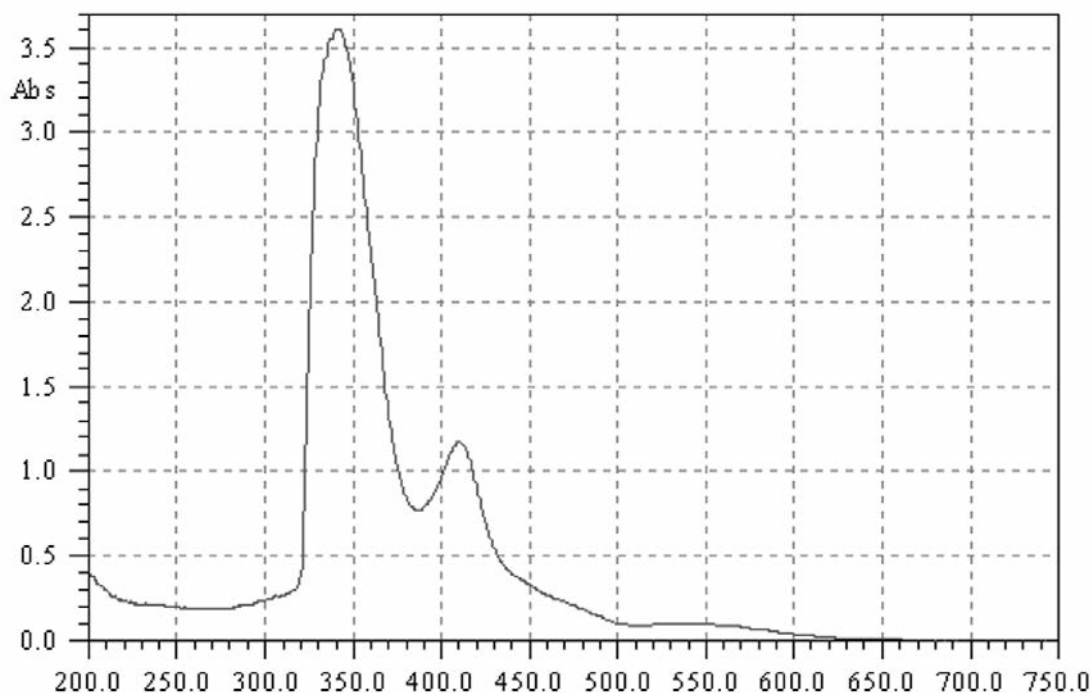


Рисунок 2.

Спектр поглощения "холостого" экстракта (ацетон : аммиак - 7:1, об/об) из ткани печени крыс, не содержащей ФС Фотолон.

Для проверки "надежности" разработанной спектрофотометрической методики количественного определения ФС Фотолон в биологической ткани нами были изучены ее аналитические характеристики.

Линейность отклика спектрофотометра (скорректированная по базовой линии площадь под длинноволновой полосой поглощения) от концентрации фотосенсибилизатора была установлена в диапазоне концентраций 0,5–17,0 мкг/мл. Было установлено, что уравнение линейной зависимости имеет вид: $S = 1,1401C + 0,0351$. Отклонение рассчитанной концентрации препарата Фотолон (по хлорину е6) в гомогенатах печени от приготовленной (принятой за 100%), полученное на основании спектрофотометрических измерений с учетом коэффициента экстракции, не превышает 9% для изученного диапазона концентраций (табл. 2).

Воспроизводимость и точность методики оценивали путём 4-х последовательных определений препарата в печени для 3-х уровней содержания Фотолон, покрывающих диапазон линейности. Относительное стандартное отклонение количественного определения препарата варьировало от 1,6 до 9,5% в зависимости от концентрационного уровня (табл. 3). Для минимальной

концентрации препарата в ткани воспроизводимость результатов количественного определения закономерно оказалась наименьшей (RSD - 9,5%). Было также показано, что экспериментально измеренная в образцах ткани концентрация препарата по сравнению с теоретической (эквивалентной 100%) для 3 уровней находится в пределах 92,2–104,9%, поэтому максимальное отклонение не превышает 7,8%. Установленный уровень вариации результатов измерения и точность методики являются допустимыми для проведения биоаналитических исследований [16].

Таблица 3. Точность и воспроизводимость спектрофотометрической методики количественного определения ФС Фотолон при различных уровнях его содержания в биологической ткани.

Уровень	Приготовленная концентрация, мкг/мл	Воспроизводимость, RSD, %	Точность, %
1	49,78	3,1	103,00
2	13,538	1,6	104,85
3	0,603	9,5	92,16

Чувствительность спектрофотометрической методики была определена как значение тангенса угла наклона прямой, описывающей зависимость отклика спектрофотометра (Н) от концентрации препарата (С). Рассчитанное эмпирическое уравнение линейной регрессии, описывающее указанную зависимость, имеет вид: $C = 114,24 \times H$. Учитывая шум спектрофотометра (0,0005 о.е.), предел обнаружения исследуемого ФС в биологической ткани составил 0,17 мкг/г.

Таким образом, полученные метрологические характеристики свидетельствуют о достаточной точности и воспроизводимости спектрофотометрической методики, что позволяет ее использовать для достоверного определения концентрации фотосенсибилизатора Фотолон в биологических тканях.

Исследование динамики накопления ФС Фотолон в ткани печени крыс методом прижизненного детектирования уровня флуоресценции в условиях in vivo.

При разработке методики исследования фармакокинетики ФС Фотолон в биологических тканях методом прижизненного детектирования флуоресценции нами было обнаружено, что техника проведения измерений оказывает существенное влияние на результаты. При различной технике проведения измерений уровня флуоресценции биологической ткани погрешность измерений может варьировать в пределах $\pm 20\%$. Низкая воспроизводимость результатов измерений, вероятно, обусловлена процессами фотодеградации ФС под действием возбуждающего излучения, вариациями угла наклона световода по отношению к поверхности биологической ткани, вариациями расстояния между детектором флуоресцентного сигнала и поверхностью ткани [17].

Уменьшить вариабельность результатов измерений, обусловленную процессами поглощения и рассеивания света биологическими тканями, можно путем использования световодов с детекторами флуоресценции небольшого

ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ФОТОЛОН

диаметра (200-600 мкм) [11]. Однако, при этом возрастает погрешность измерения, обусловленная локальной гетерогенностью биологической ткани, а также усилением аутофлуоресценции ткани, к которой детекторы небольшого диаметра особенно чувствительны. В целях достижения воспроизводимости результатов измерений и повышения “надежности” метода прижизненного детектирования флуоресценции нами были стандартизированы расстояние между поверхностью биологической ткани и детектором флуоресценции на конце световода, а также время регистрации флуоресцентного сигнала. Эмпирическим путем было установлено, что наибольшую воспроизводимость результатов измерений обеспечивает техника регистрации флуоресцентного сигнала под прямым углом к поверхности ткани, при легком касании ткани торцом оптоволоконного световода и времени считывания 10 с. Усредненное значение уровня флуоресценции биологической ткани получали путем проведения 5 равномерно удаленных друг от друга измерений по всей поверхности изучаемого органа.

Известно, что собственная флуоресценция биологических тканей (аутофлуоресценция), обусловленная присутствием эндогенных порфиринов, может привести к систематической ошибке измерений концентраций ФС в исследуемой ткани [18, 19]. В связи с этим, нами были исследованы уровни прижизненной аутофлуоресценции ткани печени интактных крыс и проведен качественный и количественный анализ содержания в ней хлорина еб спектрофотометрическим методом по методике описанной выше. Установлено, что уровень аутофлуоресценции ткани печени, не содержащей исследуемого ФС, составлял в среднем $86,43 \pm 2,23$ усл.ед. (табл. 4). В дальнейшем, при изучении динамики накопления ФС в ткани печени крыс, уровень аутофлуоресценции вычитался из измеренного сигнала.

Таблица 4. Интенсивность прижизненной флуоресценции печени крыс через 1 ч после в/в введения препарата Фотолон и концентрация хлорина еб в ткани, определенная методом спектрофотометрии.

	Доза препарата											
	до введения			1,5 мг/кг			5 мг/кг			15 мг/кг		
№ животного	0.1	0.2	0.3	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
Интенсивность прижизненной флуоресценции печени, усл.ед.	90,8	83,4	85,1	457,6	891,6	665	1988	2496,4	2199	6418	7938	8048
Концентрация препарата Фотолон в ткани печени, мкг/г	0	0	0	0,62	4,12	1,96	8,99	9,99	8,64	23,99	95,11	93,82

На основании результатов измерений уровней прижизненной флуоресценции ткани печени крыс после в/в введения ФС и данных о его количественном содержании, полученных методом спектрометрии (табл. 4), нами были построены кривые, описывающие динамику накопления и выведения препарата Фотолон как функцию времени (рис. 3, 4). По данным спектрофотометрического метода, после внутривенного введения фотосенсибилизатора в дозе 5 мг/кг наблюдается скачкообразное накопление препарата в печени с максимумом около 1 часа (рис. 3, 4). При этом концентрация хлорина еб достигает максимального уровня 12 мкг/г, после чего препарат быстро выводится из ткани и его содержание в ней через 24 часа после введения составляет менее 10% от исходного уровня. Как было показано ранее в работе [20], подобная быстрая кинетика характерна для полярных фотосенсибилизаторов. Характер и форма флуоресцентной кинетической кривой (рис. 3) оказались близкими характеру и форме кривой, полученной по данным спектрофотометрического анализа (рис. 4). Сходство между кинетическими кривыми, построенными на основании экспериментальных данных, полученных двумя различными методами, позволяет утверждать об эквивалентности результатов измерений, и, соответственно, о применимости метода прижизненного детектирования флуоресценции для изучения фармакокинетики ФС Фотолон в биологических тканях.

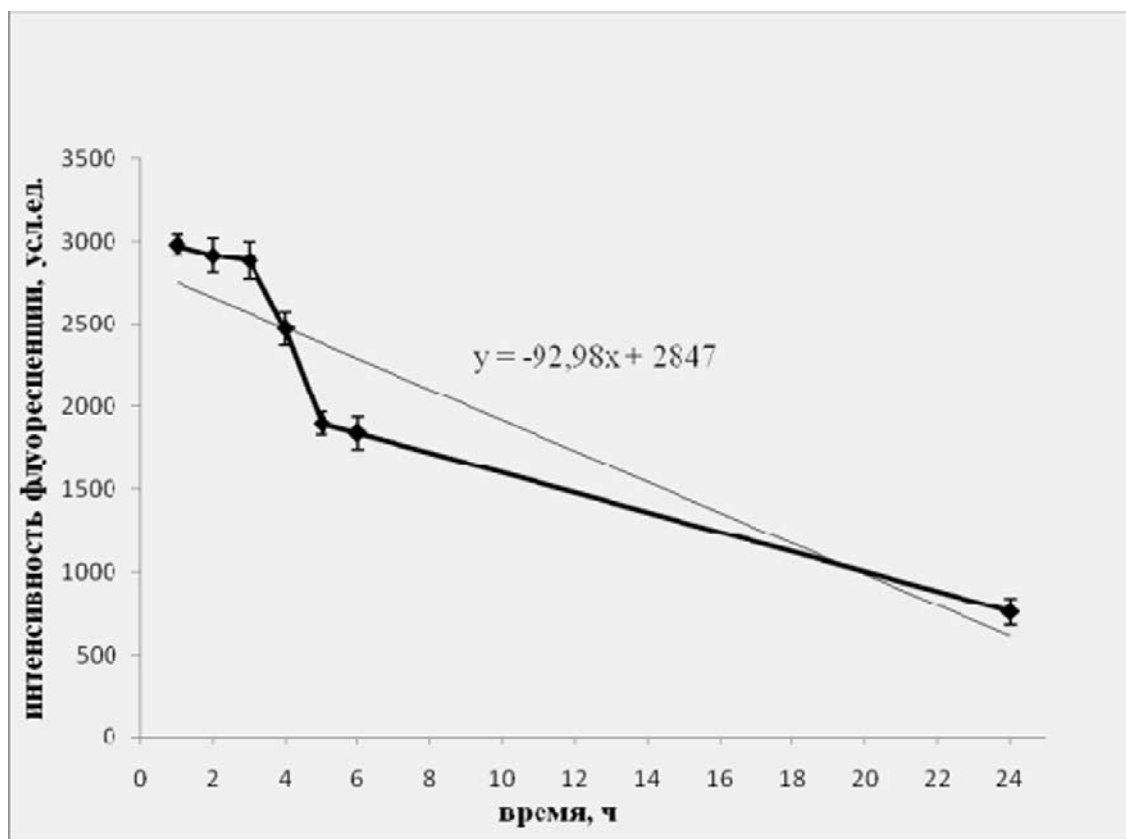


Рисунок 3.

Интенсивность прижизненной флуоресценции ткани печени крыс после в/в введения ФС Фотолон в дозе 5 мг/кг.

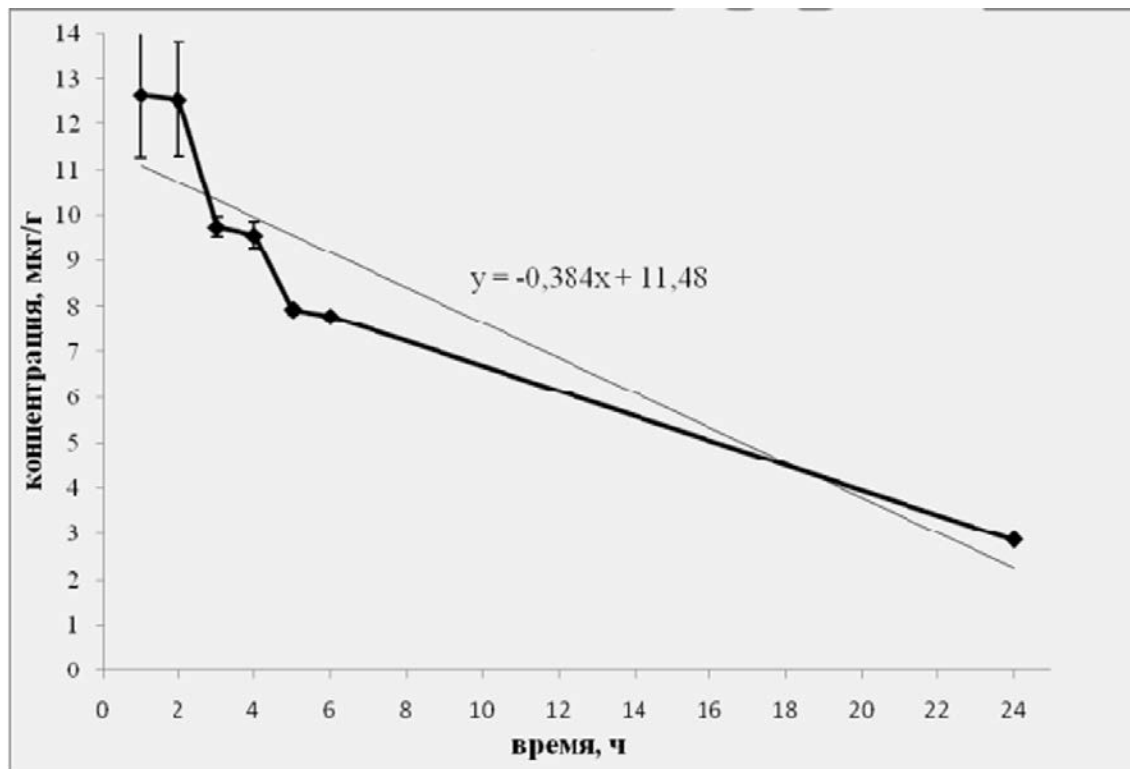


Рисунок 4.

Изменение концентрации ФС Фотолон в ткани печени крыс (мкг/кг) после в/в введения в дозе 5 мг/кг.

Известно, что при увеличении абсолютной концентрации ФС и усилении интенсивности сигнала нередко протекает явление реабсорбции люминесценции за счет ФС или эндогенных молекул, которое приводит к занижению регистрируемого отклика [14]. Так, для моно-N-аспартил хлорина еб линейная зависимость флуоресценции от концентрации наблюдалась только до уровня 0,067 мкг/мл ФС в экстракте [21]. Поэтому, практическая возможность метода прижизненного детектирования флуоресценции нами была изучена в широком интервале концентраций. Для этого концентрацию хлорина еб определяли обоими методами в максимуме накопления в ткани после введения (1 ч) в дозах 1,5, 5 и 15 мг/кг (табл. 4). Установлено, что зависимость интенсивности прижизненной флуоресценции биологической ткани (ткани печени) от концентрации препарата Фотолон, определенной методом спектрофотометрии, носит линейный характер (рис. 5) и описывается уравнением линейной регрессии вида: $y = 234,59x + 145,04$. Коэффициент корреляции составляет 0,99, что доказывает эквивалентность данных регистрируемых двумя методами и отсутствие заметной реабсорбции флуоресценции даже для ткани печени, содержащей высокую концентрацию порфириновых пигментов.

Полученные результаты позволяют утверждать, что для исследованного ФС возможно не только слежение за относительным уровнем его накопления в тканях. При использовании соответствующих калибровочных кривых возможно также быстрое определение концентрации ФС в ткани путем пересчета данных об интенсивности прижизненной флуоресценции ткани.

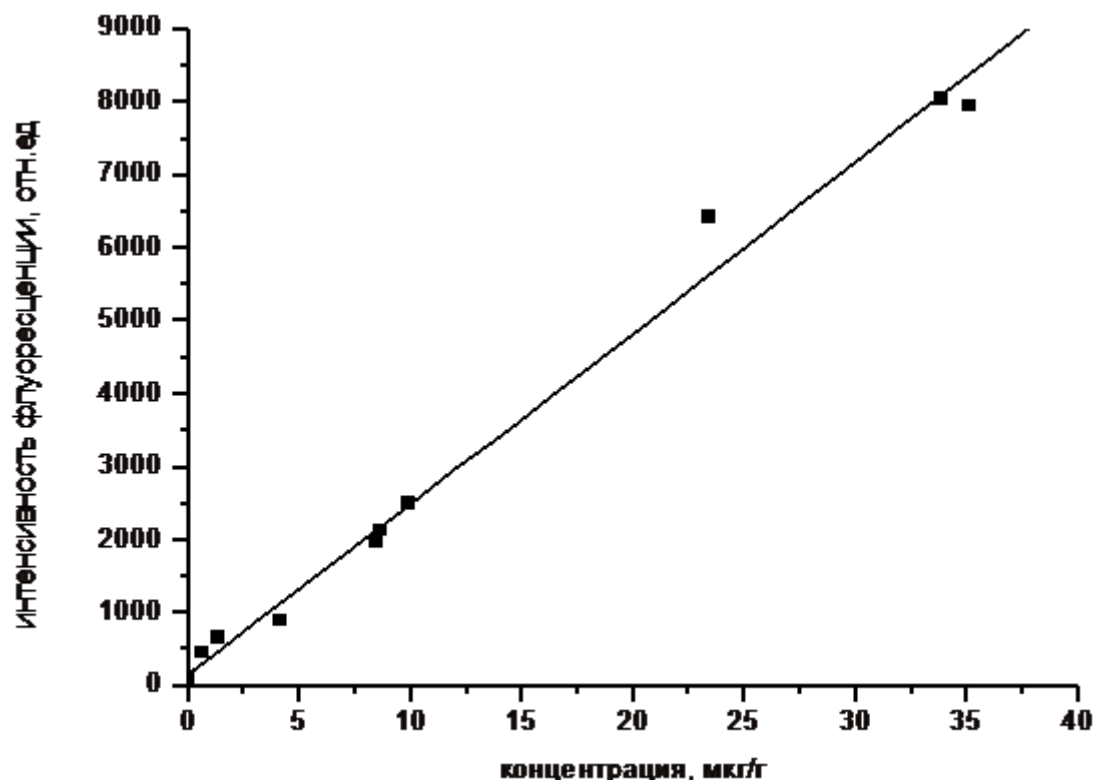


Рисунок 5.

Зависимость интенсивности прижизненной флуоресценции ткани печени от концентрации хлорофилла а, определенной спектрофотометрически *ex vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В рамках настоящей работы нами была разработана точная и воспроизводимая методика количественного определения фотосенсибилизатора Фотолон в образцах печени крыс спектрофотометрическим методом с предварительной экстракцией. Подобраны и обоснованы условия экстракции исследуемого ФС из ткани печени крыс с использованием в качестве экстрагента смеси ацетон : аммиак (7:1, об/об). Для использованной методики количественного определения ФС Фотолон методом спектрометрии изучены основные аналитические характеристики. С использованием методики количественного определения ФС Фотолон в образцах ткани печени крыс спектрофотометрическим методом дана количественная оценка результатов измерения прижизненной флуоресценции ткани печени после введения ФС. Установлена высокая ($R=0,99$) степень корреляции результатов измерений, полученных двумя различными методами. Показана пригодность метода прижизненного детектирования флуоресценции биологической ткани в условиях *in vivo* для проведения фармакокинетических исследований. Сопоставление адекватности и информативности двух различных методов измерения свидетельствуют о достоверности и практической привлекательности техники прижизненной спектрофлуориметрии *in vivo* для оценки динамики изменения концентрации фотосенсибилизаторов хлороинового ряда в биологических тканях при проведении фармакокинетических исследований, а также тканевой дозиметрии при разработке или оптимизации режимов фотодинамической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Henderson B.W., Dougherty T.J.* (1992) *Photochem. Photobiol.*, **55**, 145-157.
2. *Lee C.C., Pouge B.W., Strawbridge R.R., Moodie K.L., Bartholomew L.R., Burke G.C., Hoopes P.J.* (2001) *Photochem. Photobiol.*, **74**, 453-460.
3. *Cheung R., Solonenko M., Bush T.M., Del Piero F., Putt M.E., Hahn S.M., Yodh A.G.* (2003) *J. Biomed. Optic.*, **8**, 248-252.
4. *Patterson M.S., Wilson B.C., Feather J.W., Burns D.M., Pushka W.* (1987) *Photochem. Photobiol.*, **46**, 337-343.
5. *Bourré L., Thibaut S., Briffaud A., Rousset N., Eléouet S., Lajat Y., Patrice T.* (2002) *Photochem. Photobiol. B.*, **67**, 23-31.
6. *Thibaut S., Bourré L., Bendarras A., Juillard S., Simonneaux G., Lajat Y., Patrice T.* (2004) *J. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **1**, 181-190.
7. *Kasselouri A., Bourdon O., Demore D., Blais J.C., Prognon P., Bourg-Heckly G., Blais J.* (1999) *Photochem. Photobiol.*, **70**, 275-279.
8. *Lilge L., O'Carroll C., Wilson B.C.* (1997) *Photochem. Photobiol. B.*, **39**, 229-235.
9. *Glanzmann T., Hadjur C., Zellweger M., Grosjean P., Forrer M., Ballini J., Monnier P., van den Bergh H., Lim C., Wagnieres G.* (1998) *Photochem. Photobiol.*, **67**, pp. 596-602.
10. *Panjehpour M., Sneed R.E., Frazier D.L., Barnhill M.A., O'Brien S.F., Harb W., Overholt B.F.* (1993) *J. Lasers Surg. Med.*, **13**, 23-30.
11. *Stepp H., Beck T., Beyer W., Pfaller C., Schuppler M., Sroka R., Baumgartner R.* (2007) *Med. Laser Appl.*, **22**, 23-34.
12. *Isakau H.A., Trukhacheva T.V., Zhebentyaev A.I., Petrov P.T.* (2007) *J. Biomed. Chromatogr.*, **21**, 318-325.
13. *Isakau H.A., Trukhacheva T.V., Petrov P.T.* (2007) *J. Pharmaceut. Biochem. Analys.*, **45**, 20-29.
14. *Moan J., Ma L.W., Juzeniene A., Iani V., Juzenas P., Apricena F., Teng Q.* (2003) *Int. J. Cancer*, **103**, 132-135.
15. *Wang Z.J., He Y.Y., Huang C.G., Huang J.S., Huang Y.C., An J.Y. et al.* (1999) *Photochem. Photobiol.*, **70**, 773-780.
16. *Shah V.P.* (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation*. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, CDER, Rockville, USA, May 2001.
17. *Mang T., Kost J., Sullivan M., Wilson B.C.* (2006) *J. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **3**, 168-176.
18. *Melo C.A.S., Kurachi C., Grecco C., Sibata C.H., Castro-e-Silva O., Bagnato V.S.* (2004) *J. Photochem. Photobiol. B.*, **73**, 183-188.
19. *Kennedy J.C., Nadeau P., Petryka Z.J., Pottier R.H., Weagle G.* (1992) *Photochem. Photobiol.*, **55**, 729-734.
20. *Kessel D.* (1997) *Photochem. Photobiol. B.*, **39**, 81-83.

Поступила: 25. 05. 2008.

APPLICATION OF THE METHOD OF VITAL *IN VIVO* FLUORESCENCE INTENSITY MEASUREMENT IN BIOLOGICAL TISSUES FOR PHARMACOKINETIC STUDIES OF DIFFERENT CHLORIN-BASED PHOTOSENSITISERS

S.V. Shliakhtin¹, T.V. Trukhachova¹, G.A. Isakau¹, Y.P. Istomin²

¹RUE “Belmedpreparaty”, Fabritsyusa ul., 30, Minsk, 220007 Republic of Belarus;
tel./fax: +375 17 220 39 40; e-mail: S.Shlyakhtyn@rambler.ru

²National Center Of Oncology, Republic of Belarus, Minsk, Lesnoy-2

A precise and reproducible method of quantitative determination of the photosensitizer Photolon® in hepatic tissue of the liver of rats by means of spectrophotometric assay with preliminary chemical extraction was developed for validation of the method of *in vivo* measurement of a fluorescent signal of the tissue after injection of the photosensitizer. Using the *ex vivo* spectrophotometric technique a quantitative assessment of the results of spectrofluorescent measurements performed *in vivo* was made. A high correlation ($R^2=0,99$) between results estimated by two different techniques was shown. Also validity of the simple and easy-to-use method of *in vivo* fluorescence intensity measurements for the investigation of the pharmacokinetics and biodistribution of different photosensitizers was demonstrated.

Key words: photodynamic therapy, Photolon®(Fotolon®), chlorin e6, pharmacokinetics.