

ОПТИЧЕСКИЙ СПЕКТРОАНАЛИЗАТОР С РАСШИРЕННЫМ ДИНАМИЧЕСКИМ ДИАПАЗОНОМ ДЛЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В БИОТКАНЯХ

Г.А. Меерович^{1,2}, Е.В. Ахлюстина², Т.А. Савельева^{1,2}, К.Г. Линьков¹, В. Б. Лощенов^{1,2}

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

Резюме

В настоящее время наиболее перспективным методом для исследования фармакокинетики препаратов, обладающих выраженными флуоресцентными свойствами, является спектрально-флуоресцентный метод. В этой статье мы предлагаем алгоритм расширения динамического диапазона спектроанализатора путем автоматического мониторинга максимального значения спектральной плотности в регистрируемом спектре флуоресценции и автоматического контролируемого изменения времени накопления в зависимости от этого значения с последующей компенсацией выходного сигнала с учетом этого изменения, а также схемные решения, позволяющие реализовать этот алгоритм.

Тестирование спектроанализатора ЛЭСА-01-«Биоспек», модернизированного с использованием предложенного подхода, проводилось на дисперсиях фотосенсибилизатора на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия различной концентрации (от 0,01 мг/л до 50 мг/л), примерно соответствующих концентрациям, реализующихся в процессе исследования фармакокинетики в калибровочных образцах и тканях экспериментальных животных. Предложенные решения, реализующие алгоритм регистрации спектров флуоресценции с автоматическим изменением времени накопления в зависимости от уровня сигнала, обеспечили существенное расширение динамического диапазона спектроанализатора (до 3.5 порядков) и повышение точности при фармакокинетических исследованиях.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, фармакокинетика, спектр, интенсивность, экспозиция.

Для цитирования: Меерович Г.А., Ахлюстина Е.В., Савельева Т.А., Линьков К.Г., Лощенов В. Б. Оптический спектроанализатор с расширенным динамическим диапазоном для фармакокинетических исследований флуоресцирующих препаратов в биотканях // Biomedical Photonics.– 2019. – Т. 8, № 1. – С. 46–51. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-46-51.

Контакты: Меерович Г.А., e-mail: meerovich@mail.ru

OPTICAL SPECTROANALYZER WITH EXTENDED DYNAMIC RANGE FOR PHARMACOKINETIC INVESTIGATIONS OF PHOTOSENSITIZERS IN BIOTISSUE

Meerovich G.A.^{1,2}, Akhlyustina E.V.², Savelieva T.A.^{1,2}, Linkov K.G.¹, Loschenov V.B.^{1,2}

¹Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

Abstract

Currently, the most promising method for the study of pharmacokinetics of drugs with fluorescent properties is the spectral-fluorescent method. In this article, we propose an algorithm for expanding the dynamic range of the spectrum analyzer by automatically monitoring the maximum spectral density in the recorded fluorescence spectrum and automatically controlled changes in the accumulation time depending on this value, followed by compensation of the output signal with regard to this change, as well as hardware circuit solutions that allow this algorithm.

Testing of LESA-01-“Biospec” spectrum analyzer, upgraded using the proposed approach, was carried out on photosensitizer dispersions based on tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxylaluminium of various concentrations (from 0.01 mg/l to 50 mg/l), approximately corresponding to the concentrations realized in the process of studying pharmacokinetics in calibration samples and tissues of experimental animals.

The proposed solutions that implement the algorithm for recording fluorescence spectra with automatic change of accumulation time depending on the signal level, ensured a significant expansion of the dynamic range of the spectrum analyzer (up to 3.5 orders of magnitude) and improved accuracy in pharmacokinetic studies

Keywords: fluorescence diagnostics, pharmacokinetics, spectrum, intensity, exposure.

For citations: Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Savelieva T.A., Linkov K.G., Loschenov V.B. Optical spectroanalyzer with extended dynamic range for pharmacokinetic investigations of photosensitizers in biotissue, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 46–51. (in Russian) doi: 10.24931/2413–9432–2019–8–1–46–51.

Contacts: Meerovich G.A., e-mail: meerovich@mail.ru

Введение

Изучение фармакокинетики и биораспределения лекарственного вещества основано на оценке его концентрации в органах, тканях и биологических жидкостях организма в определенные моменты времени после введения [1]. Одним из важнейших требований при проведении таких исследований является широкий динамический диапазон метода измерения, который должен составлять не менее трех порядков.

В настоящее время наиболее перспективным методом для исследования фармакокинетики препаратов, обладающих выраженными флуоресцентными свойствами, является спектрально-флуоресцентный [1–4]. Он широко используется для оценки уровня и селективности накопления фотосенсибилизаторов (ФС), предназначенных для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики, в биологических тканях.

Используемое для таких исследований спектроскопическое оборудование, как правило, включает в себя лазер, полихроматор, оптоволоконный зонд, содержащий осветительные световоды для доставки к биоткани возбуждающего излучения и приемные световоды для доставки излучения флуоресценции от биоткани на вход полихроматора, и матричный фотоприемник на выходе полихроматора, в частности, прибор с зарядовой связью (ПЗС) или КМОП («комплементарная структура металл-оксид-полупроводник»)–линейку. Система регистрации сигнала от каждой из ячеек линейки, пропорционального ее заряду, включает аналогово-цифровой преобразователь (АЦП), блок буферной памяти и персональный компьютер (ПК) [2, 5]. При проведении спектрально-флуоресцентного исследования излучение с выхода лазера вводится в осветительный световод оптоволоконного зонда. Выходя из дистального конца осветительного световода, это излучение облучает биологическую ткань, содержащую флуоресцирующий препарат, и инициирует флуоресценцию его молекул. Интенсивность характеристической полосы флуоресценции препарата в первом приближении пропорциональна его содержанию в биоткани. Приемные световоды оптоволоконного зонда доставляют излучение флуоресценции от биоткани на вход полихроматора, где происходит спектральное разложение этого излучения, после чего

оно попадает на линейку. Сигнал с выхода линейки поступает на АЦП и в блок буферной памяти. ПК из поступающих с выхода блока буферной памяти цифровых данных, соответствующих интенсивности сигнала из каждой ячейки фотоприемника, и номеров ячеек фотоприемника, которым поставлена в соответствии с результатами калибровки определенная длина волны, формирует спектральную кривую (зависимость интенсивности от длины волны), которая отображается на мониторе ПК.

Динамический диапазон спектроанализатора определяется, в основном, характеристиками линейки. При высоких уровнях световых потоков, падающих на ячейку линейки, может происходить зарядовое насыщение сигнала этой и прилегающих ячеек линейки; при низких уровнях сигнал, связанный с падающим световым потоком, может оказаться мало различимым на фоне аппаратных шумов устройства (в первую очередь, шумов линейки). Из-за этого динамический диапазон известных устройств не превышает, как правило, двух порядков.

В настоящей статье рассматривается возможность расширения динамического диапазона спектроанализатора для фармакокинетических исследований флуоресцирующих препаратов.

Материалы и методы

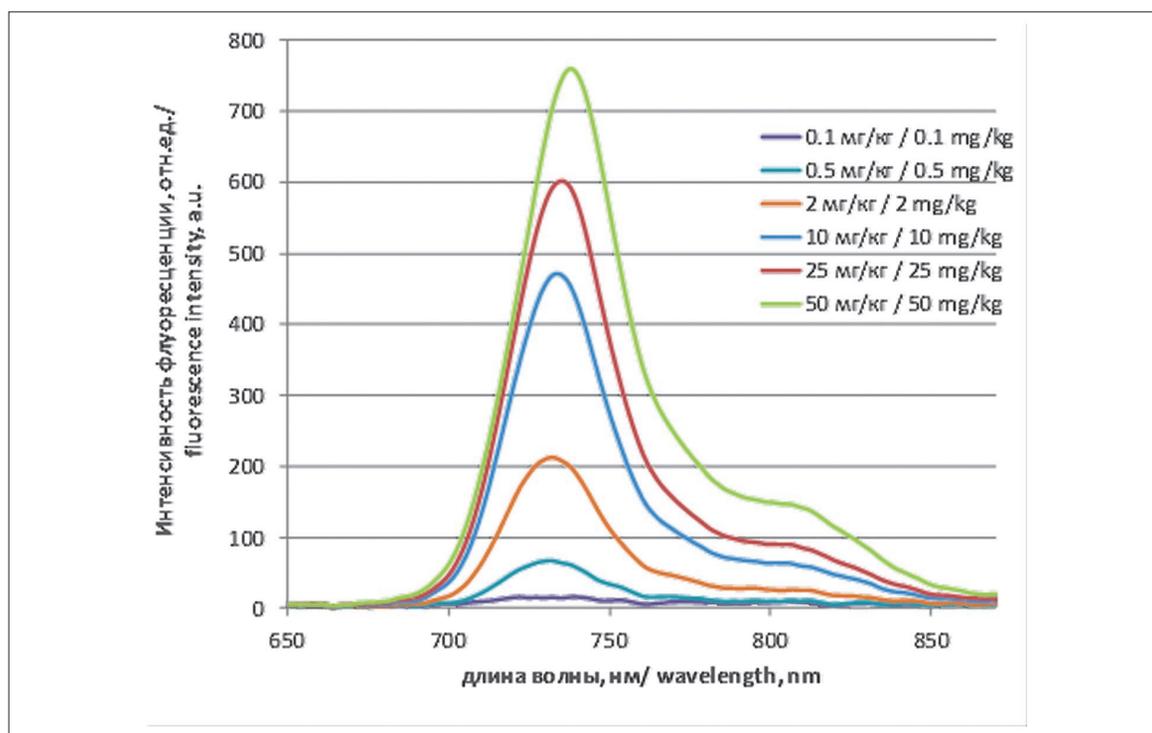
В качестве тест-объектов были использованы образцы липосомальных дисперсий тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия в дистиллированной воде с концентрациями 0,01 мг/мл; 0,05 мг/мл; 0,1 мг/мл; 0,5 мг/мл; 2 мг/мл; 10 мг/мл; 25 мг/мл; 50 мг/мл в пробирках Эппендорфа. Контрольным образцом служила пробирка Эппендорфа с водой.

Исследования флуоресценции проводились с использованием лазерного электронного спектрального анализатора ЛЭСА-01-«Биоспек» (ООО «БИО-СПЕК», Россия).

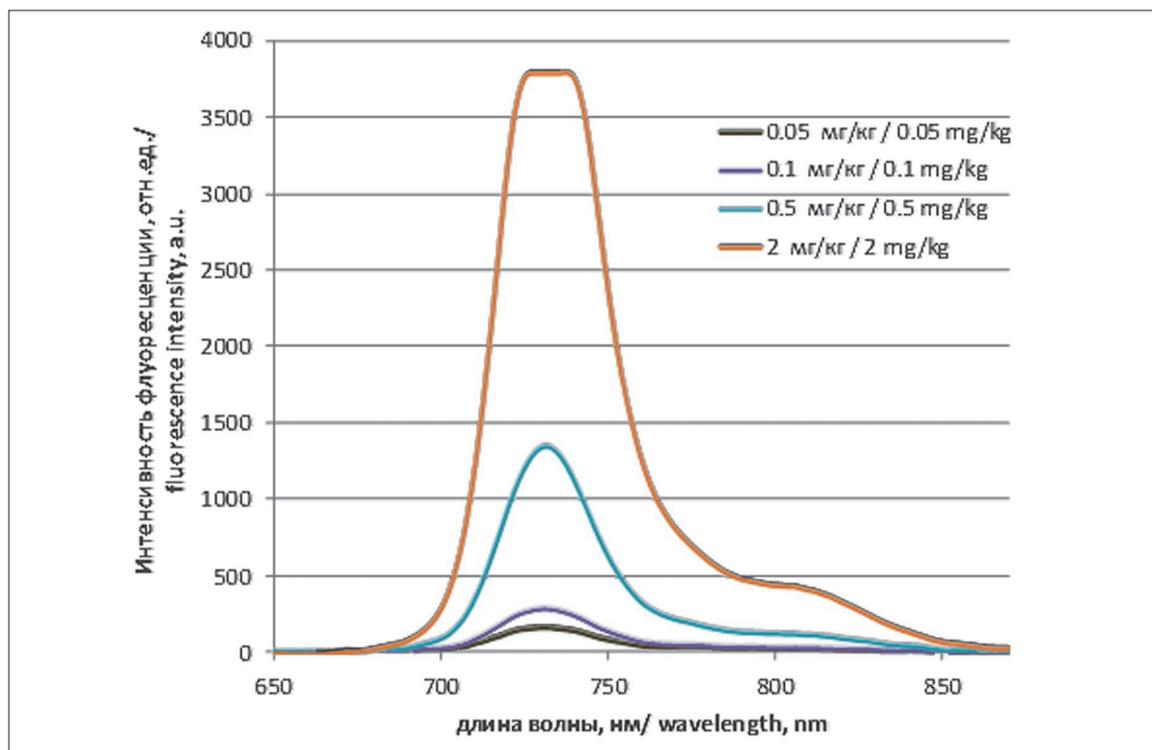
Результаты и обсуждение

Исследование зависимости выходного сигнала спектроанализатора от значения времени накопления

Результаты исследований спектров липосомальных дисперсий тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия различных концентраций пока-



а



б

Рис. 1. Спектры флуоресценции дисперсий ФС разной концентрации при времени накопления:

а – при 12 мс;

б – при 300 мс.

Fig. 1. Fluorescence spectra of PS dispersions of various concentrations with an exposure time:

а – 12 ms;

б – 300 ms

зывают, что при небольших значениях времени накопления спектроанализатор ЛЭСА-01-«Биоспек» обеспечивает неискаженную регистрацию сигналов флуоресценции дисперсий с высокой концентрацией. Однако при этом сигналы флуоресценции дисперсий с низкой концентрацией практически неразличимы на фоне аппаратных шумов (рис. 1а).

При высоких значениях времени накопления спектроанализатор обеспечивает правильную регистрацию сигналов флуоресценции при низкой концентрации ФС. Однако при регистрации флуоресценции ФС с высокой концентрацией, когда интенсивность сигнала флуоресценции большая, может произойти зарядовое насыщение сигнала ячеек линейки, соответствующих области спектрального максимума флуоресценции (рис. 1б). Поэтому работа спектроанализатора становится некорректной вследствие аппаратного искажения формы спектра.

Расширение динамического диапазона интенсивности регистрируемых сигналов флуоресценции

Для расширения динамического диапазона интенсивности сигналов флуоресценции предложен следующий подход. Постоянно во время регистрации спектрального сигнала происходит автоматический мониторинг максимального и минимального значения спектральной плотности. В случае, если это значение выходит за пределы заданного диапазона, запускается алгоритм автоматической настройки экспозиции фотоприемника, обработки и записи сигналов линейки полихроматора.

На рис. 2 представлена усовершенствованная блок-схема регистрирующей системы спектроанализатора [5] со следующими обозначениями: 1 – лазер для возбуждения флуоресценции; 2 – оптоволоконный зонд, содержащий осветительные световоды для доставки к биоткани возбуждающего излучения и приемные световоды для доставки излучения флуоресценции от биоткани на вход полихроматора; 3 – биоткань; 4 – полихроматор; 5 – ПЗС или КМОП-линейка на выходе полихроматора; 6 – АЦП; 7 – блок буферной памяти; 8– компаратор; 9 – задатчик опорного сигнала верхнего уровня; 10 – компаратор; 11 – задатчик опорного сигнала нижнего уровня; 12 – блок управления временем накопления; 13 – блок коррекции накопления; 14 – персональный компьютер (ПК).

Если сигнал всех ячеек линейки 5 меньше напряжения опорного сигнала, поступающего на опорный вход компаратора 8 из задатчика 9, или больше напряжения опорного сигнала, поступающего на опорный вход компаратора 10 из задатчика 11, совокупность сигналов, соответствующая спектру флуоресценции, из блока 7 буферной памяти без изменения поступает в цифровом виде на вход ПК 14 для построения и отображения спектра.

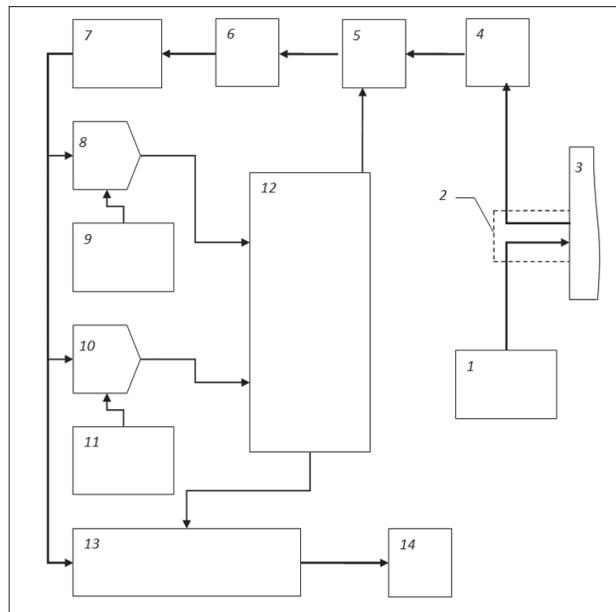


Рис. 2. Блок-схема спектроанализатора для спектрально-флуоресцентных исследований с расширенным динамическим диапазоном интенсивности сигналов флуоресценции
Fig. 2. Block-diagram of the spectra-analyzer for spectral-fluorescent studies with an extended dynamic range of intensity of fluorescence signals

Если сигнал от какой-нибудь из ячеек линейки 5 больше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 8 из задатчика 9, команда из компаратора 8 подается на блок 12 управления временем накопления, который подает на линейку 5 команду уменьшения длительности времени накопления. При уменьшенном времени накопления сигнал с выхода линейки 5, уменьшенный пропорционально времени накопления, поступает на вход блока буферной памяти 6, а с блока буферной памяти – на сигнальные входы компараторов. Если при уменьшенном времени накопления сигнал от любой из ячеек линейки меньше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 8 из задатчика 9, совокупность сигналов, соответствующая спектру флуоресценции, из блока буферной памяти подается на блок 13 коррекции накопления, где изменяется (увеличивается) обратно пропорционально времени накопления, затем поступает в цифровом виде на вход ПК для построения и отображения спектра. Аналогично, если сигнал от какой-нибудь из ячеек линейки меньше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 10 из задатчика 11, команда из компаратора 10 подается на блок 12 управления временем накопления, который в свою очередь подает на линейку команду увеличения длительности времени накопления. При увеличенном времени накопления сигнал с выхода линейки, увеличенный пропорционально времени накопления,

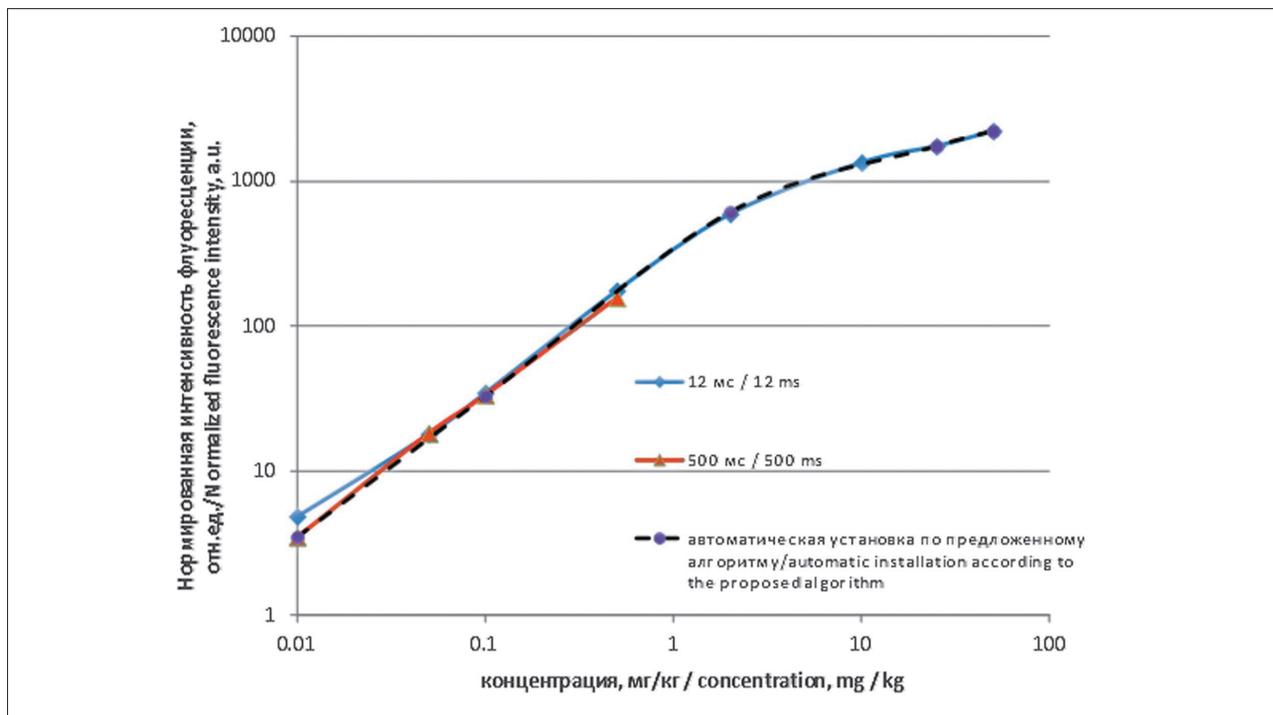


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции ФС от его концентрации при разных временах экспозиции
Fig. 3. Dependence of fluorescence intensity of PS on its concentration at various exposure times

поступает на вход блока буферной памяти, а с блока буферной памяти на сигнальные входы компараторов 8 и 10. Если при увеличенном времени накопления сигнал от всех ячеек линейки больше напряжения опорного сигнала, поступающего на вход компаратора 10 из задатчика 11, совокупность сигналов, соответствующая спектру флуоресценции, из блока буферной памяти подается на блок 12 коррекции накопления, где уменьшается обратно пропорционально времени накопления, после чего поступает в цифровой виде на вход ПК для построения и отображения спектра.

Таким образом, если значение сигнала из любой ячейки линейки выше верхней границы или ниже нижней границы заданного диапазона, время накопления прибора понижается (или, соответственно, повышается) в заданное количество раз. Если указанной корректировки экспозиции оказывается недостаточно для того, чтобы сигнал оказался в пределах допустимого диапазона интенсивностей, корректировка экспозиции осуществляется автоматически повторно до тех пор, пока сигнал не попадет в этот диапазон.

Тестирование спектроанализатора проводилось на дисперсиях фотосенсибилизатора на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия различной концентрации (от 0,01 мг/л до 50 мг/л), при-

мерно соответствующих концентрациям, реализующихся в процессе исследования фармакокинетики в калибровочных образцах и тканях экспериментальных животных.

При регистрации флуоресценции ФС с постоянным малым временем накопления происходит искажение зависимости в области малых значений концентрации, где в сигнале добавляется дополнительная положительная ошибка из-за аппаратного шума спектроанализатора (рис. 3, голубая кривая). При постоянном высоком значении времени накопления (рис. 3, красная кривая) появляется ошибка в области сигналов флуоресценции дисперсий с большими концентрациями. Более того, начиная с некоторых значений концентрации, зависящих от значения времени накопления, регистрацию сигналов ввиду зарядового насыщения части линейки проводить невозможно.

При работе спектроанализатора по предложенному алгоритму регистрации (с автоматическим изменением времени накопления в зависимости от уровня сигнала флуоресценции) регистрация спектральной информации проходила при высоких значениях отношения «сигнал-шум» и без искажения формы спектра (пунктирная кривая).

Это позволило при дальнейшей обработке сигнала построить корректную (неискаженную) зависимость интегральной интенсивности флуоресценции

дисперсий тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия от их концентрации в расширенном динамическом диапазоне значений, превышающем 3,5 порядка (Рис. 3, пунктирная кривая)

Заключение

Предложенный алгоритм регистрации спектров флуоресценции с автоматическим изменением времени накопления в зависимости от уровня сигнала обеспечил существенное расширение динамического диапазона спектроанализатора, обеспечил

повышение точности при фармакокинетических исследованиях. Кроме того, это позволило при фотодинамической терапии реализовать более точный контроль содержания ФС в опухоли непосредственно перед облучением, в процессе и после облучения, оптимальным образом выбрать время начала облучения и режим облучения в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01112А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
2. Лощенов В.Б., Линьков К.Г., Савельева Т.А., Лощенов М.В., Модель С.С., Бородкин А.В. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – Т. 2, № 3. – С. 17–25.
3. Meerovich G.A., Tiganova I.G., Makarova E.A., Meerovich I.G., Romanova Ju.M., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Koloskova Yu.S., Lukyanets E.A., Krivospitskaya N.V., Sipailo I.P., Baikova T.V., Loschenov V.B., Gonchukov S.A. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins // *J. Phys.: Conf. Ser.* – 2016. – Vol. 691. – 012011.
4. Меерович Г.А., Ахлюстина Е.В., Тиганова И.Г., Панов А.В., Тюкова В.С., Толордава Э.Р., Алексеева Н.В., Линьков К.Г., Романова Ю.М., Грин М.А., Миронов А.Ф., Лощенов В.Б., Каприн А.Д., Филоненко Е.В. Исследование фотосенсибилизатора для антибактериальной фотодинамической терапии на основе циклодекстриновой композиции метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил)-бактериопурпуримида // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 16–32.
5. Ахлюстина Е.В., Будько А.П., Ланцова А.В., Линьков К.Г., Лощенов В.Б., Меерович Г.А., Савельева Т.А. Устройство для спектрально-флуоресцентного исследования содержания флуорохромов. – Патент РФ № 2665628, 2018.

REFERENCES

1. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. CHast' pervaya* [A guide to preclinical drug research. Part One], ed. A.N. Mironov. Moscow, Grif and K Publ., 2012. 944 p.
2. Loschenov V.B., Linkov K.G., Savelieva T.A., Loschenov M.V., Model S.S., Borodkin A.V. Hardware and tool equipment for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy, *Photodynamic therapy and photodyagnosis*, 2013, vol. 2, no. 3, pp. 17–25. (In Russian)
3. Meerovich G.A., Tiganova I.G., Makarova E.A., Meerovich I.G., Romanova Ju.M., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Stepanova T.V., Koloskova Yu.S., Lukyanets E.A., Krivospitskaya N.V., Sipailo I.P., Baikova T.V., Loschenov V.B., Gonchukov S.A. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins, *J. Phys. Conf. Ser.*, 2016, vol. 691, 012011.
4. Meerovich G.A., Akhlyustina E.V., Tiganova I.G., Panov V.A., Tyukova V.S., Tolordava E.R., Alekseeva N.V., Linkov K.G., Romanova Yu.M., Grin M.A., Mironov A.F., Loschenov V.B., Kaprin A.D., Filonenko E.V. Study of photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy based on cyclodextrin formulation of 13³-N-(N-methylnicotiny)- bacteriopurpurinimide methyl ester, *Biomedical Photonics*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 16–32. (in Russian)
5. Akhlyustina E.V., Bud'ko A.P., Lantsova A.V., Lin'kov K.G., Loschenov V.B., Savelieva T.A. *Ustroystvo dlya spektral'no-fluorescentnogo issledovaniya sodержaniya fluorohromov* [Device for spectral fluorescence study of the content of fluorochromes], Patent RF no. 2665628, 2018.