

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

**Фотоиндуцированное усиление флуоресценции комплексов красителя
синего Эванса для прижизненных исследований микроциркуляции**

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПОДГОТОВЛЕННОЙ
НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ (ДИССЕРТАЦИИ)

аспиранта 4 курса
направления 03.06.01 «Физика и астрономия»
физического факультета

Намыкина Антона Александровича

Научный руководитель

доцент кафедры оптики и биофотоники

к.ф.-м.н., доцент

_____ Федосов И.В.

Саратов 2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Важным аспектом диагностики и лечения заболеваний на ранней стадии, является оценка состояния системы кровообращения и крови. Последнее время становятся популярными оптические методы удаления и диагностики раковых клеток. Например, окрашивание раковых клеток флуоресцентными красителями, позволяет точно определять границы опухоли для последующего удаления. Флуоресцентные методы визуализации кровотока позволяют проводить диагностику состояния сосудистых аневризм. А так же оценку состояния гематоэнцефалического барьера. Такие заболевания оказывают сильное влияние не только на строение сосудистых, капиллярных и лимфатических сетей, но и вызывают изменение скорости кровотока и лимфотока. Еще одним способом ранней диагностики рака, и наблюдения за восстановлением после ишемического церебрального инсульта является измерение скорости кровотока. Например, измерения скорости кровотока возле опухоли, важны для понимания ее физиологии, и позволяют назначить оптимальное лечение. Флуоресцентные методы визуализации уже используются для диагностики и лечения тяжелых заболеваний. Разработка метода измерения скорости кровотока на основе флуоресцентных методов, способна объединить сразу несколько исследований, и увеличить точность диагностирования на ранних стадиях развития рака и сосудистых аневризм.

Метод MTV (Molecular tagging velocimetry – метод флуоресцентной метки) – это оптический метод измерения скорости жидкости. Метод MTV основан на локальной модификации молекул жидкости под действием лазерного излучения. В результате фотохимической реакции преобразованные молекулы становятся помеченными, и отличимыми от остальной жидкости. Как правило, такая фотохимическая реакция приводит к изменению оптических свойств, например поглощение света или квантового выхода флуоресценции раствора вдоль пути лазерного луча. Смещение помеченного объема жидкости можно отслеживать с помощью соответствующего метода визуализации для измерения профиля скорости жидкости. Метод позволяет проводить прямые измерения среднего смещения молекул, которые составляют гомогенную жидкость, в отличие от других основанных на индикаторах методов, таких как ЦТВП (цифровая трассерная визуализация потока), ЛДА (лазерная доплеровская анемометрия), которые требуют определенной концентрации детектируемых частиц в рабочей жидкости.

В последнее десятилетие экспериментальная гидродинамика являлась основной областью применения метода MTV. Метод позволяет избежать нежелательных эффектов, связанных с дополнительно введенными частицами, а так же проводить эксперименты в условиях, когда введение частиц невозможно. Использование молекул жидкости в качестве индикаторов потока делает метод MTV перспективным для применения в области биомедицинских

исследований, которые касаются прижизненных измерений микроциркуляции крови и лимфы. В частности, мониторинг изменений объемной скорости кровотока помогает выяснить основные механизмы церебрального инсульта, ишемии миокарда и атрофии зрительного нерва.

Введение в системный кровоток нетоксичных органических красителей в течение многих лет было одобрено в качестве медицинских исследований. Флуоресцеин натрия и индоцианин зеленый используются для ангиографии глазного дна. Краситель синий Эванса используется для измерения объема циркулирующей крови и оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера у животных. Такие красители потенциально могут использоваться для исследований микроциркуляции крови на основе метода MTV, если реализовать условия для нанесения оптических меток для этих красителей.

Флуоресцентный краситель флуоресцеин натрия используется для реализации экспериментальных исследований в гидродинамике методом MTV. Так же есть сообщения, что флуоресцеин натрия применялся в качестве флуоресцентного красителя для прижизненных измерений микроциркуляции лимфотока методом MTV, однако о применении красителя для исследований скорости кровотока *in vivo*, методом MTV не сообщалось. У такого применения флуоресцеина есть как минимум два недостатка:

- 1) Концентрация красителя после введения в систему кровообращения быстро снижается;
- 2) Интенсивный фиолетовый или синий свет вызывает фотометрическое повреждение кровеносного сосуда и тканей вокруг из-за сильного поглощения его кровью и биологическими тканями.

Краситель синий Эванса образует флуоресцентные комплексы с белками плазмы крови и сохраняет постоянную концентрацию в системе кровообращения длительное время. Флуоресценция комплексов синего Эванса наблюдается на длине волны 680 нм, при длине волны возбуждения 620 нм. Такие излучения слабо поглощаются кровью и биологическими тканями, что позволяет наблюдать флуоресценцию комплексов синего Эванса *in vivo* и *in vitro*. Что делает краситель более подходящим для постоянного контроля скорости кровотока методом MTV. Однако о фотообесцвечивании флуоресценции комплексов синего Эванса и белков плазмы крови не сообщалось.

В работе нами был обнаружен эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции синего Эванса в растворе плазмы крови и в сосудах головного мозга при предварительном воздействии интенсивным лазерным излучением (361 Вт/см^2) с длиной волны 635 нм. Было продемонстрировано применение эффекта для прижизненного измерения методом флуоресцентной молекулярной метки скорости кровотока в капиллярах и сосудах различного диаметра. Данные, полученные в ходе работы, позволили сделать вывод, что эффект фотоиндуцированной флуоресценции связан с цис-транс изомеризацией молекул ЭС в связанном состоянии с белками альбумина. Мы впервые наблюдали возможность фотоиндуцированного усиления флуоресценции в растворах плазмы крови, а также в составе цельной крови прижизненно.

В работе мы исследовали и сопоставили проявление эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции (ФИУФ) в водном растворе альбумина и в плазме крови при одинаковых условиях. Наше исследование позволило провести качественную оценку проявления эффекта в условиях отсутствия прочих белков плазмы крови, и непосредственно в плазме крови *in vitro*. Мы провели спектральное исследование флуоресценции растворов ЭС плазмы крови и альбумина, и установили расхождение спектров флуоресценции в длинноволновой области. Мы обнаружили эффект насыщения и запаздывания усиленной флуоресценции.

Актуальность темы исследования обусловлена большой практической значимостью и востребованностью флуоресцентных методов, предоставляющих новые возможности визуализации сосудов и измерения скорости биологических жидкостей.

Целью данной работы является изучение эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции комплексов синего Эванса и белков плазмы в растворах, в условиях *in vitro* и *in situ*, а так же разработка методов прижизненного измерения скорости кровотока на основе метода MTV.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Экспериментально исследовать зависимость эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции растворов синего Эванса и белков плазмы от концентрации красителя и длины волны возбуждения.
2. Установить зависимости воздействия лазера фотоактивации и лазера освещения необходимых для появления эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции, в случаях различной плотности мощности и температуры растворов.
3. Исследовать времени запаздывания и затухания усиленной флуоресценции в зависимости от состава раствора красителя синего Эванса.
4. Описать экспериментальную модель эффекта ФИУФ для растворов синего Эванса с белком альбумином и плазмой крови.
5. Разработать методику проведения прижизненных экспериментов по измерению скорости кровотока в сосудах различных диаметров.
6. Разработать алгоритм обработки флуоресцентных изображений для получения профиля скорости кровотока.

Объектом исследования являются эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции раствора комплексов синего Эванса и белков плазмы.

Предмет исследования:

- Проявление процесса усиления интенсивности флуоресценции в растворах комплексов синего Эванса и белков плазмы, в условиях различных концентраций и мощности облучения.

- методы анализа динамики эффекта ФИУФ растворов комплексов синего Эванса и белков плазмы, и его связь со скоростью кровотока.

Достоверность полученных результатов обеспечивается корректностью используемых методов регистрации, обработки и анализа полученных флуоресцентных изображений. А так же к измерению скорости кровотока и профиля скорости в поперечном сечении сосуда, которые находятся в соответствии с измерениями других авторов, с помощью существующих методов измерения абсолютной скорости кровотока.

Научная новизна:

1. Впервые обнаружен эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции для растворов комплексов синего Эванса и белков плазмы крови
2. Впервые исследованы процесс запаздывания и затухания эффекта ФИУФ для растворов комплексов синего Эванса и белков плазмы крови.
3. Разработан новый метод измерения скорости кровотока в сосудах головного мозга мышей с использованием эффекта ФИУФ.

Практическая значимость работы заключается в изучении и систематизации процессов протекающих при фотоиндуцированном усилении флуоресценции в растворах комплексов красителя синего Эванса и белков плазмы крови. Разработанный метод измерения скорости кровотока позволяет производить измерение скорости крови для сосудов и капилляров различного диаметра, определять диаметр и восстанавливать профиль распределения скорости в поперечном сечении сосуда. Дальнейшее развитие позволит проводить измерение профиля распределения скорости в нескольких пространственно разделенных поперечных сечениях одного или нескольких сосудов. Разработанный метод обработки изображений и отслеживания, флуоресцентных меток может быть использован для решения широкого круга задач в таких методиках как FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching-метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания), MTV, и т.д.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Лазерное облучение растворов, содержащих комплексы красителя синего Эванса и белков плазмы крови, вызывает усиление интенсивности флуоресценции красителя в растворе.

- 2 При фотоиндуцированном усилении флуоресценции растворов комплексов синего Эванса и белков плазмы наблюдаются эффекты насыщения и запаздывания усиленной флуоресценции.
- 3 Эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции имеет место при смешивании водного раствора ЭС с плазмой крови, цельной кровью, а также при внутривенном введении водного раствора ЭС в кровь животного.
- 4 Эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции комплексов синего Эванса и белков плазмы крови можно использовать для прижизненных исследований по измерению скорости кровотока (и восстановлению профиля скорости) в кровеносных сосудах головного мозга мышей, методом MTV.

Научно-квалификационная работа состоит из введения, трех глав, заключения. Первая глава посвящена обзору современных методов анемометрии и флуоресцентной микроскопии. Во второй главе описан процесс фотоиндуцированного усиления флуоресценции, и ее зависимость от времени облучения лазером фотоактивации, температуре и концентрации растворов. В третьей главе описано проявление эффекта ФИУФ при внутривенном введении красителя и описан разработанный метод измерения скорости крови в сосудах головного мозга. Полный объем работы составляет 98 страниц, включая 20 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит 153 наименований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрен эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции растворов комплексов синего Эванса и белков плазмы крови, впервые обнаруженный соискателем. Были установлены следующие закономерности. Интенсивность эффекта ФИУФ зависит от концентрации раствора. Эта зависимость имеет пороговый характер, при значениях концентраций ниже 0,04 % эффект не наблюдался. Установлена оптимальная концентрация раствора синего Эванса и белка альбумина, которая составила 0,07%. Для данной концентрации наблюдается максимальный прирост фотоиндуцированного усиления, а так же максимальная фоновая флуоресценция раствора. Выявлена зависимость флуоресценции от температуры раствора, наблюдается характерное температурное тушение флуоресценции. Установлены две ранее не наблюдавшиеся особенности – запаздывание и насыщение усиленной флуоресценции. Время запаздывания зависит от состава раствора, для комплексов синего Эванса и плазмы крови время составило 300 ± 10 мс, а для раствора белка альбумина 45 ± 15 мс. Время запаздывания зависит от концентрации раствора и интенсивности воздействия лазера фотоактивации. Для достижения эффекта насыщения для раствора синего Эванса и альбумина минимальное время воздействия составляет не более 10 мс, для раствора плазмы крови эффект достигался при 160 мс

воздействия при плотности мощности 200 кВт/см^2 . Установлена зависимость усиления флуоресценции от плотности мощности воздействия ЛФА. Время затухания эффекта до половины интенсивности от максимальной не зависит от длительности облучения «пишущего» лазера и составило 2 с. и 1,32 с., для раствора плазмы крови и белка альбумина соответственно. Исследован спектр флуоресценции для растворов синего Эванса и белков плазмы крови и белка альбумина. Спектр флуоресценции раствора синего Эванса и белков плазмы смещен на 17 нм в длинноволновую область, относительно спектра флуоресценции альбумина и СЭ. В работах подробно изучается зависимость от скорости реакции преобразования *цис*-изомеров, а так же обратной релаксации *транс*-изомеров от значения рН растворов азокрасителей. Данная зависимость не была проверенна для эффекта ФИУФ в растворах комплексов синего Эванса и белков плазмы в рамках данной работы.

На основе полученных экспериментальных данных построена эмпирическая модель фотоиндуцированного усиления флуоресценции, которая позволяет систематизировать полученные данные. Модель справедлива как для растворов синего Эванса и плазмы крови, так и для растворов с альбумином. Было установлено, что эффект фотоиндуцированного усиления флуоресценции проявляется при внутривенном введении 1% водного раствора синего Эванса лабораторным животным. Наблюдения проводились на сосудах головного мозга мышей. Плотность мощности ЛФА в этом случае составляла 365 Вт/см^2 при продолжительности облучения 10 мс. При этом повышение интенсивности в области сосуда, облученного ЛФА, над фоном составляло 20%, что на 10-15% ниже, чем наблюдалось в условиях *in vitro* экспериментов. Данное различие можно объяснить рассеиванием света в тканях мозга и в стенках кровеносных сосудов.

На основании наблюдений за движением помеченной области, был разработан метод измерения скорости кровотока с применением эффекта фотоиндуцированного усиления флуоресценции. Метод был применен для измерения скорости крови в сосудах головного мозга мышей. Полученные результаты совпадают с результатами, полученными ранее при помощи других методов. Исследовано две группы сосудов – диаметром менее и более 50 мкм. Скорость кровотока растет по мере уменьшения диаметра. Построен профиль распределения скорости кровотока внутри сосуда.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на конференциях:

1. The International Society on Oxygen Transport to Tissue ISOTT'2015(Wuhan, China, 2015)
2. Saratov Fall Meeting SFM'2016 (Саратов, 2016)
3. Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике (Саратов, 2016)
4. Saratov Fall Meeting SFM'2017 (Саратов, 2017)
5. Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике (Саратов, 2017)

6. Photonics West 2018 (San Francisco, 2018)

Исследования по теме диссертации проводились при частичной поддержке грантами:

1. Российского Научного Фонда: в рамках проектов №16-15-10252(2016 - 2018 годы), № 17-75-20069 (2017 -2020 годы)
2. Министерство образования и науки РФ в рамках проекта №3.5507.2017/6.7

Публикации.

1. Namykin A. A. et al. Intravital molecular tagging velocimetry of cerebral blood flow using Evans Blue //Journal of biophotonics. – 2018. – Т. 11. – №. 8. – С. E201700343.
2. Намыкин А.А., Хороводов А.П., Семячкина-Глушковская О.В., Тучин В.В., Федосов И.В. Фотоиндуцированное усиление флуоресценции красителя эванса синего в водном растворе альбумина //Оптика и спектроскопия. – 2019. – №. 5. – С. 636.
3. Namykin A. A. et al. Fluorescent angiography of chicken embryo and photobleaching velocimetry //Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10336. – С. 103360V.
4. Semyachkina-Glushkovskaya O. et al. The role of meningeal lymphatic system in the brain clearing after traumatic intracerebral hemorrhage // J. Neurotrauma. 2018. Vol. 35, № 16. P. A207.
5. Semyachkina-Glushkovskaya O. et al. Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing //Journal of biophotonics. – 2018. – Т. 11. – №. 8. – С. e201700287.
6. Glushkovskaya-Semyachkina O. et al. The lymphatic mechanisms of brain cleaning: application of optical coherence tomography and fluorescence microscopy //Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10717. – С. 107171V.
7. Borisova E. et al. Photodynamic diagnostics of stress-induced gastrointestinal neoplasia in laboratory animals using 5-aminolevulinic acid and Al-phthalocyanine //Optical Diagnostics and Sensing XVIII: Toward Point-of-Care Diagnostics. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10501. – С. 105011E.
8. Semyachkina-Glushkovskaya O. et al. Optical coherent tomography and fluorescent microscopy for the study of meningeal lymphatic systems //Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10717. – С. 107171Y.
9. Zinchenko E. et al. Critical changes in the brain leads to the intracranial hemorrhages in newborn rats //2016 International Conference Laser Optics (LO). – IEEE, 2016. – С. S2-19-S2-19.

10. Glushkovskaya-Semyachkina O. et al. The lymphatic mechanisms of brain cleaning: application of optical coherence tomography and fluorescence microscopy //Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – T. 10717. – C. 107171V.
11. Semyachkina-Glushkovskaya O. et al. The stress and vascular catastrophes in newborn rats: mechanisms preceding and accompanying the brain hemorrhages //Frontiers in physiology. – 2016. – T. 7. – C. 210.
12. Torres E. N. D. et al. Optical monitoring of the meningeal lymphatic clearance after opening of blood-brain barrier //Saratov Fall Meeting 2018: Computations and Data Analysis: from Nanoscale Tools to Brain Functions. – International Society for Optics and Photonics, 2019. – T. 11067. – C. 1106713.
13. Rogatina K. V., Namykin A. A., Postnov D. E. Vascular mesh and diffusive bells: 2D modeling of blood-brain barrier leakage //Saratov Fall Meeting 2018: Computations and Data Analysis: from Nanoscale Tools to Brain Functions. – International Society for Optics and Photonics, 2019. – T. 11067. – C. 1106712.