

Научные обзоры



© ЛЫЧКОВСКАЯ Е. В., ВАЙС Е. Ф., САЛМИНА А. Б., САЛМИН В. В.

УДК 616-092.19

ОПТИЧЕСКАЯ БИОПСИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ ФЛУОРОФОРОВ

Е. В. Лычковская, Е. Ф. Вайс, А. Б. Салмина, В. В. Салмин

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения РФ, ректор – д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра биохимии с курсами
медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, зав. – д. м. н., проф. А. Б. Салмина;
кафедра медицинской и биологической физики, зав. – д. физ.-мат. н. В. В. Салмин.

Резюме. Статья представляет научный обзор литературных данных о методах исследования живых тканей – оптической биопсии, с использованием экзогенных флуорофоров. Показана возможность применения экзогенных флуорофоров в прижизненных исследованиях и клинической диагностике.

Ключевые слова: оптическая биопсия, экзогенные флуорофоры, фотосенсибилизаторы.

THE OPTICAL BIOPSY WITH THE USE OF EXOGENOUS FLUOROPHORES

E. V. Lychkovskaya, E. F. Vise, A. B. Salmina, V. V. Salmin

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V. F. Voyno-Yasenytsky

Abstract. The article presents a review of the scientific literature data about the methods of investigation the live tissues - optical biopsy, using exogenous fluorophores. It was shown the possibility of using exogenous fluorophores in the intravital researches and clinical diagnostics.

Key words: optical biopsy, exogenous fluorophores, photosensitizers.

В течение последних лет оптические методы находят все более широкое применение в биомедицинских исследованиях, особенно в различных областях медицинской диагностики и при контроле за эффективностью терапии. Среди оптических методов наибольшее распространение получают методы исследования живых тканей, объединенные названием «оптическая биопсия» [20,34].

Основным преимуществом оптической биопсии является неинвазивность исследования. Другим преимуществом является возможность с высокой скоростью, в реальном масштабе времени, исследовать метаболические превращения в клетках живых тканей и диагностировать их морфологические и биохимические изменения [26, 32, 34].

В оптической биопсии наиболее часто используется люминесцентный анализ. Объясняется это, прежде всего высокой чувствительностью и информативностью данного метода [16, 30]. Но главное его достоинство, в применении к биологическим объектам, заключается в том, что он позволяет следить за состоянием живых систем, не повреждая их, то есть является методом неразрушимого контроля [18]. В люминесцентном анализе особое место занимают методы, основанные на регистрации различий во флуоресцентном излучении патологических очагов и окружающих нормальных тканей, которые возникают при освещении поверхности ткани светом определенной

длины УФ, видимого диапазонов спектра. Для описания этих различий используют термин «флуоресцентный контраст, который может иметь эндогенное или экзогенное происхождение». В первом случае, флуоресцентный контраст возникает при использовании эндогенных флуорофоров [4]. Эндогенные флуорофоры – биологические вещества тканей, способные к флуоресценции [16]. Во втором случае, флуоресцентный контраст возникает в результате селективного окрашивания патологических очагов экзогенными красителями или флуоресцентными маркерами [4, 44]. Экзогенные флуорофоры, несмотря на то, что являются посторонними веществами для биотканей, имеют лучшие спектральные свойства, по сравнению с природными макромолекулами [16, 30]. Флуоресценция этих веществ довольно чувствительна к изменениям, которые происходят при развитии патологического процесса [10]. Источником диагностической информации является визуальная оценка флуоресцентных изображений, которые позволяют изучить пространственное распределение в тканях экзогенных флуорофоров. Либо количественный анализ спектров лазер-индуцированной флуоресценции в виде спектрального распределения сигнала, последовательно, поточечно снимаемого с исследуемого объекта, как правило, с использованием оптоволоконных зондов в точке поверхности ткани [4, 26, 32].

В настоящем обзоре рассмотрены особенности методов оптической биопсии и экзогенные флуорофоры, которые применяются в этих методах.

Основные свойства экзогенных флуорофоров

Основными спектральными характеристиками экзогенных флуорофоров являются параметры флуоресценции: интенсивность флуоресценции, спектр излучения, спектр возбуждения, квантовый выход флуоресценции. Изменение этих параметров несет определенную взаимно дополнительную информацию об флуорофоре и его микроокружении [22].

Основными свойствами экзогенных флуорофоров являются: фотостабильность, растворимость в воде, химическая активность, биологическая инертность, биосовместимость и чувствительность [13]. Наряду с этими важнейшими свойствами для разработки флуорофоров в ближайшей перспективе должны являться: максимальное приближение осмолярности контрастного препарата к осмолярности плазмы; длительное время циркуляции препарата в кровеносной системе для контрастной ангиографии высокого разрешения [25]. Однако, не все экзогенные флуорофоры являются фотостабильными, водорастворимыми и биоинертными веществами. В связи с этим, флуорофорам предъявляют определенные требования, для получения точной и достоверной информации *in vivo*.

Требования для экзогенных флуорофоров в оптической биопсии

Во-первых, интенсивность флуоресценции. Поскольку в любой среде имеются вещества с собственной флуоресценцией или тушители флуоресценции, то чем выше интенсивность флуоресценции метчика, тем в меньших количествах он может быть обнаружен.

Во-вторых, флуорофор должен иметь достаточно специфический и не размытый спектр. Это позволяет выделить его люминесценцию даже на фоне интенсивной собственной флуоресценции всего объекта [13]. Специфичность связывания флуорофора с тканью определяет пригодность его для целей специфического обнаружения, что особенно существенно в медицинской диагностике [30]. Флуорофоры должны иметь высокую селективность к патологическим очагам клеток или тканей и не накапливаться в нормальных тканях [14].

В-третьих, флуорофор должен иметь неизменный состав и желательно состоять из одного вещества, поскольку многокомпонентный флуорофор плохо очищается от примесей и соответственно трудно будет прогнозировать его эффекты [6, 14].

В-четвертых, флуорофоры должны проявлять низкую токсичность и фототоксичность для кожи. Флуорофоры *in vivo* должны быть биологически нейтральными молекулами и быстро выводиться из организма [13, 25].

Наконец, иметь интенсивный максимум поглощения в видимой и ближней ИК-области электромагнитного спектра. В *in vivo* анализе биотканей, с точки зрения возможности более глубокого зондирования ткани,

оказывается предпочтительной видимая и ближняя ИК-область спектра 750-850 нм, поскольку в этой области минимизирована аутофлуоресценция тканевых компонентов и фотодеструкция флуорофора [26,42,49]. Вследствие этого, в спектрах флуоресценции в ближней ИК области наблюдается высокое соотношение «полезный сигнал/шум» и высокая чувствительность к детекции сигнала [26,39].

Многочисленные синтезированные соединения лишь приближаются к этим требованиям. Современные флуорофоры являются химически чистыми веществами, с максимумом поглощения выше 650 нм, обладают низкой фототоксичностью для кожи.

Флуорофоры, используемые в оптической биопсии

Весьма распространено мнение о том, что наиболее эффективными контрастными веществами для клинического использования, являются экзогенные флуорофоры: *флуоресцеин* и *индоцианин зеленый* [42,47,49,51,52,56]. Эти соединения применяются во флуоресцентной ангиографии или ангиоскопии ретины и сосудов радужной оболочки [50,52].

В методах оптической биопсии, в частности, в фотохимиотерапии, особое место занимают экзогенные фотосенсибилизаторы: производные *порфиринов*, *хлоринов*, *фталоцианинов*. Эти соединения применяются в качестве инициаторов химических реакций в биологических тканях, также их используют как контрастные вещества в фотодинамическом воздействии на опухолевые ткани (табл.1) [9,10,13,22,28]. Облучение светом определенной длины волны данных флуорофоров вызывает довольно интенсивную и специфическую флуоресценцию, тем самым определяя область поражения ткани [26].

Следует отметить также о применении в люминесцентной диагностике препаратов тетрациклинового ряда. Установлена особенность тетрациклина и его производных избирательно накапливаться в опухолевых клетках и давать характерного желтого цвета люминесценцию при воздействии сине-фиолетового света. Тетрациклин и производные применяются наиболее часто в диагностике злокачественных образований желудка [18].

Таким образом, данные соединения применяются в методах оптической биопсии и лечении различных заболеваний как онкологического, так и неонкологического генеза.

Флуоресцентная ангиография с использованием экзогенных флуорофоров

В офтальмологических исследованиях уже несколько десятилетий используется метод флуоресцентной ангиографии для оценки ретинальной и хориоидальной циркуляции и состояния гематоофтальмических барьеров в глазу [12].

В основе метода лежит возможность наблюдать заполнение сосудов глазного дна красителем благодаря прозрачности оптических сред глаза [6, 40]. В этом методе используется два красителя: флуоресцеин и индоцианин зеленый. Они различаются не только спектрами поглощения и эмиссии, но и фармакологическими характеристиками (особенно в отношении способности связывания с белками крови),

а также по особенностям выведения из организма и прохождению через стенки сосудов в хориоидеи и сетчатке [29].

Флуоресцеин представляет собой биологически нейтральную слабую двухосновную кислоту из группы ксантеинов; используется в виде натриевой соли, хорошо растворимой в воде; обладает очень высокой эмиссионной способностью в видимой области электромагнитного спектра, хотя имеет плохую фотостабильность [11,12,42,44,51]. Преимуществом флуоресцеина является высокая чувствительность к исследуемым образцам; «флуоресцентный контраст», на фоне здоровой ткани достигает 50:1 [26].

При введении в кровь, 80-85% флуоресцеина связывается с альбуминами плазмы [11]. Однако, эти связи слабы и лабильны, значительно зависят от температуры и pH крови. Благодаря небольшим размерам, молекулы флуоресцеина легко проникают через большинство биологических мембран путем диффузии [9]. Время окрашивания кожи и слизистых оболочек достигает максимума через 10 минут после введения. Период распространения флуоресцеина натрия, во время проведения флуоресцеиновой ангиограммы, составляет 5-20 секунд; освобождение тканей от флуоресцеина происходит в течение 24-48 часов, в основном через печень и почки. Начиная с 5 секунды, проводят фотографирование глазного дна, с помощью фундус – камеры [12, 29]. Фундус-камера, излучает синий свет с длиной волны 480-500 нм и имеет фильтр 500-600 нм в режиме фотографирования. Эти длины волн соответствуют пикам поглощения света флуоресцеином и его свечением в возбужденном состоянии [6,12,40]. Молекула флуоресцеина не видна в обычном свете, при возбуждении на длине волны 490 нм преобразует световую энергию в длинноволновой области с длиной волны 530 нм [11].

Ангиограмма с флуоресцеином систематически выполняется как с целью подтверждения диагноза, так и для проведения дифференциальной диагностики. При оценке ангиограммы учитывают длительность действия флуорофора и характер распределения его в каждой из анатомически дифференцируемых областей глазного дна [12].

Другое вещество *индоцианин зеленый (ICG)* представляет собой трикарбоцианиновый краситель с ярко выраженным пиком поглощения в ближней – инфракрасной области на длине волны 790 нм и эмиссией 835 нм [7,31,47,49]. В отличие от флуоресцеина ICG имеет меньший квантовый выход, его флуоресценция составляет 1/25 от таковой у флуоресцеина [7, 9]. Способность ICG, излучать в ближней ИК – области, обеспечивает контрастность визуализации ткани на уровне (10-45):1 и дает возможность исследовать глубоко лежащие патологические очаги [26]. *Индоцианин зеленый* биологически нейтральный и водорастворимый краситель, при введении в кровь, ICG на 98% связывается с белками плазмы крови [11]. В отличие от флуоресцеина, который свободно просачивается через стенку сосудов, до 98% ICG связывается с белками крови, что замедляет его экстравазацию и позволяет лучше изучать ангиоархитектонику [29]. Однако, отмечается

способность ICG экстравазально проникать в опухолевые ткани или пространство вокруг нее, в зависимости от степени повреждения сосудистой системы васкулярной сети опухоли. Вследствие этого, при использовании ICG можно ориентироваться в направлении диагностического поиска [7, 9, 50, 51]. Краситель быстро выводится из организма; побочные эффекты у препарата наблюдаются реже, чем при использовании флуоресцеина натрия, в основном вследствие содержания в смеси йода, применяемого для стабилизации красителя [11]. Тем не менее, ICG может индуцировать гиперчувствительные реакции [11, 29].

Ангиограмма с ICG, по сравнению с флуоресцеином, обеспечивает лучшее пропускание через зоны геморрагий, участки пигментации и экссудации; зачастую оказывается решающим методом в исследовании и постановке диагноза внутриглазной опухоли [1].

Экзогенные фотосенсибилизаторы в фотодинамической терапии

В настоящее время, достаточно хорошо изучено и широко применяется в оптической биопсии быстро развивающееся направление – фотодинамическая терапия опухолей (ФДТ). Фотодинамическая терапия – это мини-инвазивный метод лечения поверхностных эпителиальных опухолей с помощью фотосенсибилизаторов (ФС) [6, 27, 40]. Принцип метода основан на способности ФС селективно накапливаться в ткани опухоли, и при локальном воздействии облучения определённой длины волны генерировать синглетный кислород или кислородсодержащие свободные радикалы, что приводит к гибели опухолевых клеток [14,20,40]. Данный метод выгодно отличается от лучевой и химиотерапии высокой избирательностью поражения опухолевой ткани, отсутствием местных и системных осложнений, позволяет сочетать в одной процедуре, как лечение, так и флуоресцентную диагностику опухолевого процесса [14, 28].

Сегодня существует огромное множество сенсибилизаторов, которые применяются в ФДТ (см. табл.1). Порфирины и гематопорфириновые производные (ГПП) являются первыми сенсибилизаторами ФДТ [8,24,30]. Применение гематопорфириновых производных – *Фотифрин, Фотосан, Фотогем*, не получило широкого распространения в целях флуоресцентной диагностики в силу длительной фотосенсибилизации кожи пациентов и необходимости соблюдения светового режима в течение 4-6 недель после системного введения препаратов [9, 25, 27]. Кроме того, эти соединения довольно токсичны, не достаточно эффективно поглощают свет в ИК области спектра и являются агрегативно неустойчивыми, то есть легко образуют агрегаты, которые теряют фотодинамические свойства [6, 40].

В течение последнего десятилетия в фотодинамической терапии злокачественных образований большой интерес в качестве ФС вызывают тетрапиррольные соединения, в частности, производные ряда хлорофилла. Среди этих соединений большое распространение получили восстановленные порфирины с интенсивной полосой поглощения

Таблица 1

Экзогенные флуорофоры и фотосенсибилизаторы, используемые в оптической биопсии

Фото-сенсибилизатор	Преимущества	Недостатки	Применение	Пик поглощения	Лит-ра
Производные гематопорфирина Фотофрин Фотогем Фотосан	Первые сенсибилизаторы. Простота изготовления из доступных веществ. Высокая терапевтическая активность.	Представляют смесь веществ. Токсичны, неселективны. В высокой концентрации задерживаются в клетках ретикулоэндотелиальной системы, печени, почках, селезенки, воспалительных тканях. Недостаточно эффективно поглощают свет в ИК области спектра, фотодинамическая активность весьма умеренна.	Рак матки, легких, пищевода, мочевого пузыря, пищеварительного тракта, мозга.	630 нм	6,27, 28
Бензопорфирин (хлорин) (Vertiporfirin)	Химически однороден. Высокая скорость аккумуляции в опухолях. Короткий интервал между введением и облучением. Быстрое выведение, в течение 1ч.	Не растворим в воде, требует приготовления липосомальных форм.	Базальноклеточная карцинома, Лечение возрастной макулярной дегенерации. Лечение немеланомного рака кожи.	689 нм	8,3
Хлорин Е6 (хлорин) (Фитодитазин)	Чистое вещество, растворимое в воде, глубокое проникновение в ткани (эффективное, вызывающее деструкцию опухолевой ткани). Эффективно генерирует синглетный кислород.	Высокотоксичен. Чистый хлорин е ₆ и его соли являются малоперспективными ФС, вследствие повышенного сродства к нормальному сосудистому эндотелию, паренхиме многих органов и пониженного – к опухоли и раковым клеткам	Рак легких, простатической железы. Эффективен в офтальмологии.	662 нм	4,28
Радахлорин (хлорин)	Смесь трех веществ, каждое из которых может иметь свое назначение или мишень. Эффективно проникает и накапливается в опухолевых тканях, растворим в воде.	Это смесь веществ, что создает трудности при фармацевтической стандартизации.	ФДТ глазных заболеваний	654 нм	28
Метатетрагидроксифенил хлорин (Фоскан)	Чистое вещество. Наиболее эффективен, имеет достаточно хорошее накопление во многих злокачественных опухолях; очень мала терапевтическая доза (0,15 мг/кг).	Цитотоксичен, гидрофобен, период выведения большой, неселективен.	Рак головы и шеи, простатической, поджелудочной железы и бронхов.	652 нм	4, 6
5-аминолевулиновая кислота (Аласенс)	Индукцирует эндогенный синтез протопорфирина IX. Чистое вещество, хорошее накопление, амфифильность. Низкая токсичность. Быстрая элиминация.	Потребность в анальгетизации при введении препарата.	Базальноклеточная карцинома, рак мозга; диагностика рака мозга, мочевого пузыря, яичников.	635 нм	6,57, 60
Фталоцианины (Фотосенс)	Высокий флуоресцентный контраст. Фотодинамически активен.	Медленная элиминация.	Рак бронхов, печени, кожи, молочной железы, пищеварительного тракта.	670 нм	3,6,28
Флуоресцеин	Аккумуляция в опухолях. Высокий флуоресцентный контраст, вследствие высокой эмиссионной способности. Свободная диффузия через стенки сосудов.	Флуоресцеин излучает в видимой области, поэтому нет возможности исследовать глубоко лежащие патологические очаги.	Исследование микроциркуляции в органах, проходимости желчных протоков и кишечника, определение зоны воспалительных процессов	488 нм	30, 56,47
Индоцианин зеленый	Хорошая растворимость в воде. Экстравазальное проникновение в опухолевые ткани. Быстро элиминирует. Аккумуляция в лимфатической, сосудистой системе и мочевыделительном тракте.	Медленная диффузия через стенки сосудов, вследствие взаимодействия с белками крови.	Ангиография глазного дна, сетчатки, роговицы, кровеносных сосудов. Контрастное вещество в нейронавигации опухолей головного мозга.	780 нм	47
Порфицены	Хорошее накопление в опухолях и воспалительных очагах, высокая терапевтическая активность.	Сложность производства, высокая чувствительность организма к препарату.	Опухоли различной локализации.	630 нм	17
Тетрациклин	Тропность к раковым клеткам, способность люминесцировать под действием сине-фиолетовых лучей. Усиление свечения по мере прогрессирования атрофического процесса желудка. Быстро элиминирует.	Сложность и громоздкость проведения исследования.	Диагностика рака желудка, бронхов	380 нм	30

Примечание: ФДТ – фотодинамическая терапия опухоли.

в области 650-800 нм, такие как хлорины, бактериохлорины и фталоцианины [2, 6]. При этом, одной из проблем остается повышение селективности накопления ФС в опухолях, так как вследствие неселективного накопления характерна невысокая эффективность лечения и повышенная чувствительность кожи к дневному свету [8, 23, 28].

Важным производным хлорофилла является хлорин *eб* и его производные, например, темпорин, Foscan. Они активно поглощают свет в полосе 652-664 нм, имеют высокий коэффициент экстинкции и выход синглетного кислорода. «Foscan» обладает большей селективностью и цитотоксичностью и гораздо меньшей кожной фототоксичностью по сравнению с производными гематопорфирина [28]. Однако период между введением препарата и облучением составляет 96 часов.

Бактериохлорины – тетрапирролы, спектры поглощения, которых имеют максимумы в ближней ИК области, 720-780 нм, что делает их привлекательными для ФДТ. Сравнение бактериохлорина *a* и гематопорфирина показало большую способность первого к генерации синглетного кислорода. Модификация бактериохлоринов открывает большие перспективы к использованию этих соединений в ФДТ опухолей [47].

Фталоцианины (Pc) группа фотосенсибилизаторов второго поколения, которые являются структурными аналогами порфиринов Pc. Эти соединения характеризуются сильными полосами поглощения при 670-770 нм в красной области спектра [17, 47]. Наиболее перспективным представителям данного класса являются сульфированные фталоцианины алюминия, в особенности *дисульфоталоцианин алюминия* [8]. Данный препарат проявляет высокую терапевтическую активность [17, 23].

Особый интерес вызывают порфиразины. *Порфиразин* Pz 247 имеет эмиссию в приемлемом для биомедицинских исследований диапазоне длин волн, в ближней ИК-области (NIR) с $\lambda > 700$ нм, что необходимо для максимального проникновения в ткани; показывает преимущественное накопление в клетках опухоли *in vivo*. Однако, порфиразины обладают значительной фототоксичностью [17].

Следует отметить, что при сравнении способности интенсивно поглощать свет в длинноволновой красной области – бактериохлорины ($\lambda_{\max} = 668-828$ нм), обыкновенно оказываются эффективнее хлоринов ($\lambda_{\max} = 630-738$ нм), а хлорины – порфиринов ($\lambda_{\max} = 574-656$ нм) [23]. Кроме того, хлориновые тетрапиррольные фотосенсибилизаторы менее токсичны порфиринов и фталоцианинов и имеют высокую скорость выведения, поэтому они более подходят для использования в ФДТ [9, 25].

В методе фотодинамического воздействия уникальным фотодинамическим агентом является *5-аминолевулиновая кислота* (5-АЛК) [21, 28, 57, 60]. Во-первых, она представлена практически во всех клетках человека как промежуточный продукт синтеза гема. Во-вторых, АЛК сама по себе является не фотосенсибилизатором, а метаболическим стимулятором эндогенного синтеза протопорфирина IX [14, 25].

Избыточное введение экзогенной АЛК в организм, позволяет обойти регуляторную стадию процесса гемобразования и индуцировать эндогенный синтез протопорфиринов [19, 21, 56, 57, 60].

Введение аминолевулиновой кислоты проводят за 2-3 часа до операции, в количестве 20 мг/кг. Накопление протопорфирина IX в опухоли происходит быстро с высоким флуоресцентным контрастом опухоли и окружающей ткани. Это служит важным фактором для установления и уточнения границ опухоли при проведении флуоресцентной диагностики [9]. С помощью эндоскопа, после 30-360 минут, проводится видеоконтроль и флуоресцентный спектральный анализ [20, 22, 26]. Так, во время исследования лазер возбуждает молекулы протопорфирина, накопившегося в опухоли, иницируя флуоресценцию протопорфирина IX в диапазоне 630 - 700 нм [57]. При этом, свет от лазерного источника фокусируется на входной конец Y – образного волоконно-оптического катетера, проведенный через биопсийный канал эндоскопа и передается по нему к исследуемому объекту. Облучение ткани производится как при непосредственном контакте с ним катетера, так и на расстоянии (1-4 мм) [21]. Визуальную оценку границ новообразований и количества участков поражения проводят по характерному красному свечению, которое можно наблюдать в синем свете [21, 57]. На этом характерном свечении основан метод флуоресцентной диагностики верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта. Кроме того, 5-АЛК успешно применяется в нейронавигации опухолей головного мозга [9]. Преимуществом 5-АЛК является низкая токсичность и небольшой период выведения из организма. Препарат после перорального приема в течение 24 ч полностью выводится с мочой, не накапливаясь в тканях организма.

Флуоресценция экзогенных флуорофоров позволяет определить накопление их в опухоли или другом патологическом очаге *in vivo*, а также выявлять локализацию опухолевой или поврежденной ткани на микроскопическом уровне.

Экзогенные флуорофоров в неинвазивном мониторинге pH среды

Внутриклеточный pH – важный модулятор клеточных функций [10, 58]. Тканевый pH является индикатором физиологических процессов. Понижение pH в клетках или тканях является показателем развития многочисленных системных патологий. Например, в солидных опухолях и при гипоксии, уровень pH среды составляет от 5,8 до 7,7 [58]. В процессе гибели клетки происходит выравнивание локальных величин pH в разных микрообъектах клетки и во внешней среде [10]. Неинвазивный мониторинг pH в тканях и клетках является удобным инструментом в медицинской диагностике.

В зависимости от поставленной задачи определение pH оптическими сенсорами может быть реализовано в различных форматах [5, 37]. Для измерения pH тканей используют оптические электроды или планарные

сенсорные мембраны [35, 41, 43, 45]. Для измерения pH в клетках применяют микрокапсулы флуоресцентных индикаторов [36]. В том и другом случае, оптическая детекция pH основана на pH-зависимых изменениях адсорбции и флуоресценции индикаторов [46].

Оптические электроды-оптроды – это миниатюрные устройства, представляющие собой элемент волоконной оптики – световод, имеющий очень малый диаметр (до десятков микрон), изготовленный из диоксида кремния или реже органических прозрачных в оптической части спектра полимеров, например, полистирола, целлюлозы или ее эфиров [15]. Оптоволоконно имеет нетоксичную природу, гибкость, способность передавать сигнал на дальние расстояния [35]. На торце световода закреплен индикатор, в качестве источника излучения используют лазер. Кислотно-основный индикатор иммобилизуется в матрицу сенсора с помощью ковалентного взаимодействия между молекулой индикатора и матрицей [5, 15, 26, 35, 38, 43]. В качестве полимерной матрицы часто используют гидрофобные полиуретановые производные целлюлозы [54]. Иммобилизованные флуорофоры в биосовместимые полимерные матрицы сенсоров проявляют наибольшую эффективность, специфичность и фотостабильность [36, 37, 44]. Они дают возможность проводить непрерывный неинвазивный мониторинг концентраций протонов в среде, позволяют локально детектировать сигнал с высоким разрешением [58].

Для изучения пространственного распределения pH в тканях применяют мультиплетный метод [54]. Данный метод основан на использовании планарных сенсорных мембран. Планарные сенсорные мембраны представляют собой оптические устройства, с инкапсулированными молекулами люминофоров [45, 48]. Микрокапсулы люминофоров иммобилизованы в матрицу мембраны сенсора [58]. В качестве люминофоров используют pH краситель – флуоресценизотиоцианат (FITC), флуоресцирует в области 525 нм и рутениум (II) трис - (4,7-дифенил - 1,10 – фенантролин) $[Ru(dpp)3]$, фосфоресцирует в области 597 нм [53, 41]. FITC является гидрофильным, стабильным и нетоксичным индикатором, $[Ru(dpp)3]$ используется в качестве эталона [54]. Особенностью данного метода является различное время жизни люминесценции красителей. Время жизни FITC менее 5 наносекунд, тогда как время жизни рутениума составляет 6 микросекунд [45, 54]. Красители одновременно возбуждаются в области 460 нм светоиспускающим диодом, люминесценция регистрируется с помощью прибора зарядовой связи (CCD-камера) с оптическим фильтром для регистрации эмиссии в области 530 нм [48]. Планарную сенсорную мембрану наносят на поверхность ткани или кожного покрова. Время измерения составляет 5 минут [45]. Этот метод является неинвазивным, позволяет проводить мониторинг $[H^+]$ в режиме реального времени и исследовать процессы роста опухоли кожи [58].

Определение pH в клетках

Определение pH в клетках возможно при помощи микрокапсул, содержащих экзогенные флуорофоры –

индикаторы. Индикаторы pH являются слабыми кислотами с особыми спектральными свойствами, которые изменяются в ответ на повышение или понижение уровня pH в исследуемой среде [33, 58, 59]. Они входят в состав оптических pH сенсоров – микрокапсул. Микрокапсулы представляют собой полимерные структуры с высокой проницаемостью сквозь клеточные мембраны, имеют послойный характер их формирования: внутри своей структуры они содержат молекулы флуоресцентных красителей, внешний слой может быть снабжен рецепторами или антителами для адресной доставки [41].

Среди большого разнообразия индикаторов наиболее чувствительными являются цианиновые красители. Это обусловлено высокой скоростью ответа на изменения уровня pH и большой амплитудой сигнала [30, 33, 55]. Одним из ключевых преимуществ этих флуорофоров является интенсивная флуоресценция в кислой среде, тогда как в щелочной среде цианины не функционируют [58].

Для определения уровня pH в клетках используют, так называемые, FRET-сенсоры, которые содержат две молекулы флуоресцеина, в качестве доноров, и одну молекулу BODIPY в качестве акцептора энергии. В основе механизма их действия лежит безизлучательный перенос энергии (ферстеросовский резонансный перенос энергии – FRET).

Эффективность переноса энергии от донора к акцептору модулируется окислительным потенциалом флуоресцеина, который в свою очередь зависит от $[H^+]$ в среде. Например, в кислой среде ($pH < 6$) флуоресцеин активно передает энергию акцептору – BODIPY с осуществлением интенсивной флуоресценции. При большем значении pH молекулы флуоресцеина неактивны, в кислой и щелочной среде спектры флуоресценции различаются пиками интенсивности [38, 39].

Таким образом, существуют весьма разнообразные методы определения pH, которые дают возможность оценить состояние тканей в неинвазивной диагностике.

С целью повышения эффективности флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии в настоящее время работы в области разработки фотосенсибилизаторов идут по нескольким основным направлениям. Во-первых, это усовершенствование существующих флуорофоров за счет химической модификации (внедрение новых боковых заместителей, хелатирование ионов металлов, использование полимерных покрытий).

Во-вторых, повышение селективности доставки молекул флуорофора к клеткам-мишеням за счет использования дополнительных высокоспецифичных агентов. Интенсивно исследуется возможность повышения избирательности накопления флуорофоров с применением разнообразных носителей: липосом, эмульсий, микросфер и др. [17].

Завершая этот краткий обзор можно констатировать, что оптическая биопсия имеет значительные диагностические возможности. Методы оптической биопсии

являются эффективным средством изучения биологических систем различной степени организации — от биомолекул до клеток, биотканей и отдельных органов животных и человека. Экзогенные флуорофоры в этих методах — действенные и удобные инструменты.

Литература

1. Абдуллаева Э.А., Сайдова Л.Х., Зейналова И.Ф. Клиническая значимость ангиогенной невазкулярной терапии в лечении субретинальной неоваскулярной мембраны при сложной миопии // *Офтальмология*. — 2012. — № 10. — С. 53-56.
2. Беликов А.В., Скрипник А.В. Лазерные биомедицинские технологии. — СПб.: СПбГУ - Итмо, 2008. — 116 с.
3. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Каплан М.А., Пушкова Т.Н. Фотодинамическая терапия при неоваскуляризации роговицы с фотосенсибилизатором Фотолан // *Рефракционная хирургия и офтальмология*. — 2009. — Т. 9, № 1. — С. 4-13.
4. Булгакова Н.Н., Смирнов В.В., Фабелинский В.И., Федотов А.Г., Казачкина Н.И., Капанадзе Г.Д. Лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп: доклиническая апробация на экспериментальной опухолевой модели // *Биомедицина*. — 2013. — № 2. — С. 108-122.
5. Бурмистрова Н.А., Колонтаева О.А., Русанова Т.Ю., Иноземцева О.А., Суетенков Д.Е., Горин Д.А. Структуры ядро-оболочка и полиэлектролитные капсулы с иммобилизованными кислотно-основными индикаторами // *Известия Саратовского университета*. — 2013. — Т. 13, № 4. — С. 5-12.
6. Гельфонд М.Л. Фотодинамическая терапия в онкологии // *Практическая онкология*. — 2007. — Т. 8, № 4. — С. 204-210.
7. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Кочубей В.И., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б. In vivo исследования взаимодействия индоцианина зеленого с эпидермисом человека // *Письма в журнал технической физики*. — 2001. — Т. 27, вып. 14. — С. 63-67.
8. Головина Г. В., Новиков Ф. Н., Ольшевская В. А., Калинин В. Н., Штиль А. А., Кузьмин В. А. Константы комплексообразования Zn-, Ni- и Pd-производных пурпурина-18 с сывороточным альбумином // *Журнал физической химии*. — 2012. — Т. 86, № 11. — С. 1887-1889.
9. Горяйнов С.Ф., Потапов А.А., Гольбин Д.А., Зеленков П.В., Кобяков Г.Л. Флуоресцентная диагностика и лазерная биоспектроскопия как один из методов мультимодальной навигации в нейрохирургии // *Вопросы нейрохирургии*. — 2012. — № 6. — С. 57-65.
10. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. — М.: Наука, 1989. — 277 с.
11. Кацнельсон Л.А., Лысенко В.С., Большанская Г.И. Клинический атлас патологии глазного дна. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 120 с.
12. Котляр К.Е., Дроздова Г.А., Шамшинова А.М. Гемодинамика глаза и современные методы ее исследования // *Глаукома*. — 2006. — № 4. — С. 71-77.
13. Красовицкий Б.М., Болотин Б.М. Органические люминофоры. — Лен. отд-е: Химия, 1976. — 976 с.
14. Кудинова Н.В., Березов Т.Т., Фотодинамическая терапия рака: поиск идеального фотосенсибилизатора // *Биомедицинская химия*. — 2009. — Т. 55, вып. 5. — С. 558-569.
15. Кузнецов В.В. Определение pH // *Соросовский образовательный журнал*. — 2001. — Т. 7, № 4. — С. 44-50.
16. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. — М.: Мир, 1986. — 496 с.
17. Лукьянец Е.Л. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика* — 2013. — № 3. — С. 3-16.
18. Лисовский В.А., Щедрунов В.В., Барский И.Я. Люминесцентный анализ в гастроэнтерологии. — Л.: Наука, 1984. — 236 с.
19. Лобанок Е.С., Василевич И.Б., Воробей А.В. Индуцируемое 5-АЛК накопление порфиринов в клетках системы крови // *Биомедицинская химия*. — 2011. — Т. 57, вып. 2. — С. 195-200.
20. Лощенов В.Б., Стратонников А.А. Физические основы флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии // *Сборник трудов МИФИ*. — 2000. — Т. 4. — С. 53-54.
21. Патока Е.Ю., Харнас С.С., Заводнов В.Я., Аблицов Ю.А., Рыбин В.К., Коган Е.А., Завражина И.Н., Каримова Л.Н., Березин А.Н., Лощенов В.Б. Исследование спектров флуоресценции ALA-индуцированного PP IX периферических опухолей in vivo // *Электронный журнал «Исследовано в России»*. — 2003. — № 6. — С. 1527-1536. URL: <http://zhurnal.ane.relam.ru/articles/2003/129.pdf> (дата обращения: 30.07.2003).
22. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. — М.: Наука, 1989. — С. 240.
23. Решетников А.В., Швец В.И., Пономарев Г.В. Водорастворимые тетрапиррольные фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии рака // *Успехи химии порфиринов*. — СПб.: НИИ Химии СПбГУ. — 1999. — Т. 2, Гл. 4. — С. 70-114.
24. Рогаткин Д.А., Быченков О.А., Лапаева Л.Г. Точность, достоверность и интерпретация результатов in vivo лазер-флуоресцентной диагностики в спектральном диапазоне флуоресценции эндогенных порфиринов // *Оптический журнал*. — 2009. — № 11. — С. 46-53.
25. Сорокина К.Н., Тулупов А.А., Толстикова Т.Г., Усов В.Ю. Современные подходы к созданию контрастных препаратов для магнитно-резонансной томографической диагностики // *Бюллетень сибирской медицины*. — 2011. — № 6. — С. 79-85.
26. Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. — М.: Физматлит, 2010. — 488 с.
27. Ударцева О.О., Андреева Е.Р., Буравкова А.Б. Накопление фотосенса и протопорфирина в различных клетках мезенхимного происхождения // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. — 2013. — № 2. — С. 102-106.
28. Филоненко Е.В. История развития флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии и их возможности в онкологии // *Российский химический журнал*. — 2013. — Т.12, №2. — С. 1-12.
29. Хайман Х., Кельнер У., Ферстер М. Атлас по ангиографии глазного дна / под ред. Астахова Ю.С., Лисочкиной А.Б. — М.: Медпресс-информ, 2008. — 192 с.
30. Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И. Спектральный люминесцентный анализ в медицине. — М.: Наука и техника, 1989. — 140 с.

31. Alander I., Kaartinen I., Laakso A., Valisnu P. Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery // *International Journal of biomedical Imaging*. – 2012. – Vol. 2012, № 7. – P. 1-7.
32. Andersson-Engels S., Klinberg C., Svanberg K., Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics // *Physics medicine and biology*. – 1998. – № 42. – P. 815-824.
33. Berezin M, Guo K. Near-infrared fluorescence lifetime pH-sensitive probes // *Biophysical Journal*. – 2011. – Vol. 100, № 8. – P. 2063-2072.
34. Bigio I., Mourant J. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* – 1997. – № 42. – P. 803-814.
35. Biran I., Yu X., Walt D. Optrode – based fiber optic biosensors.-Elsevier. *Optical biosensors Today and Tomorrow*, 2008. – P. 3-83.
36. Borisov S.M., Wolfbeis O., *Optical biosensors // Chemical reviews*. – 2008. – № 108. – P. 423-461.
37. Ferrari L., Rovati L., Fabbri P., Pilati F. Disposable Fluorescence Optical pH Sensor for Near Neutral Solutions // *Sensors*. – 2013. – № 13. – P. 484-499.
38. Han J., Burgess K. Fluorescent indicators for intracellular pH // *American chemical society*. – 2009. – № 30. – P. A-T.
39. Hilderbrand S.A., Weissleder R. Near-infrared fluorescence: applications to in vivo molecular imaging // *Current opinion in chemical biology*. – 2010. – № 14. – P. 71-79.
40. Jnarranz A., Jaen P., Sanz-radriges F., Cuevas J., Gonzales S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications // *Clin. Transl oncology*. – 2008. – № 10. – P. 148-154.
41. Kim H., Jeong Y., Heo J., Rhu J., Hwang K. A wide – range luminescence pH sensor based on ruthenium (II) complex // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2009. – Vol. 30, № 3. – P. 539-540.
42. Kobayashi H., Ogawa M., Alford R., Choyke P., Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging // *Chemical Reviews*. – 2010. – № 5. – P. 2620-2640.
43. Korostynska O., Arshak K, Gill E. Arshak A. Materials and techniques for in vivo pH monitoring // *Ieee sensors Journal*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 20-28.
44. Leblond F., Davis S.C., Valdes P.A., Pogue B.W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications // *Journal of photochemistry and photobiology*. – 2010. – № 98. – P. 77-94.
45. Liebsch G., Klimant J., Krause C., Wolfbeis O. Fluorescent imaging of pH with optical sensor using time domain dual lifetime referencing // *Anal. Chem.* – 2001. – № 73. – P. 4354-4363.
46. Lobnik A., Oehme I., Murkovic I., Wolfbeis O. pH optical sensors based on sol-gels: chemical doping versus covalent immobilizations // *Analytica chemical acta*. – 1998. – № 367. – P. 159-167.
47. Mathejczyk J. E. Spectroscopically well-characterized RGD optical probe as a prerequisite for lifetime-gated tumor imaging // *Mol. Imaging*. – 2011. – № 6. – P. 469-480.
48. Meier R.J., Schreml S., Wang X., Landthaler M., Babilas P., Wolfbeis O.S. Simultaneous photographing of oxygen and pH in vivo using sensor film // *Angewandte chemie*. – 2011. – Vol. 50, № 11. – P. 10893-10896.
49. Merian J., Gravier J. Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: From preclinical validations to clinical translations // *Molecules*. – 2012. – № 17. – P. 5564-5591.
50. Nguyen O.T., Tsien R. Y. Fluorescence - guided surgery with live molecular navigation – a new cutting edge // *Nature reviews cancer*. – 2013. – № 13. – P. 1-10.
51. Quek C., Leong K. Near-Infrared fluorescent nanoprobe for in vivo optical imaging // *Nanomaterials*. – 2012. – № 2. – P. 92-112.
52. Robertson T, Bunel F, Roberts M. Fluorescein derivatives in intravital fluorescence Imaging // *Cells*. – 2013. – № 2. – P. 591-606.
53. Schreml S., Meier R., Wolfbeis O., Landthaler M., Szeimies R., Babilas P. 2D luminescence imaging of pH in vivo // *PNAS*. – 2011. – Vol. 108, № 6. – P. 2432-2437.
54. Stich M., Fischer L.H., Wolfbeis O.S. Multiple fluorescent chemical sensing and imaging // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39, № 8. – P. 102-114.
55. Tang B., Yu F., Li P., Tong L., Duan X., Xie T., Wang X. A Near-infrared neutral pH fluorescent probe for monitoring minor pH changes // *American chemical society*. – 2009. – № 131. – P. 3016-3023.
56. Van den Berg N.S., van Leeuwen W.B., van der Poel H.G. Fluorescence guidance in urologic surgery // *Current opinion*. – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 109-120.
57. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wanczyk K, Golab J. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer // *Molecules*. – 2011. – № 16. – P. 4140-4164.
58. Wang R., Yu C. Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 1004-1013.
59. Wolfbeis O. Chemical sensing using indicator dyes // *Optical fiber sensors*. – 1997. – Vol. 4, chap. 8. – P. 53-107.
60. Zhang L, Fang Y, Fang Y. Enhancement techniques for improving 5-aminolevulinic acid delivery through the skin // *Dermatologica sinica*. – 2011. – № 29. – P. 1-7.

References

1. Abdullayeva E.A., Saidova L.Kh., Zeynalova I.F. The clinical significance of angiogenic non-vascular therapy in the treatment of subretinal neovascular membrane in a complex myopia // *Ophthalmology*. – 2012. – №10. – P. 53-56.
2. Belikov A.V., Skripnick A.V. *Laser biomedical technologies*. SPb.: St. Petersburg State University – ITMO, 2008. – 116 p.
3. Belyi Yu.A., Tereshchenko A.V., Kaplan M.A., Pushkova T.N. Photodynamic therapy for corneal neovascularization with a photosensitizer Photolan // *Refractive surgery and ophthalmology*. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 4-13.
4. Bulgakova N.N., Smirnov V.V., Fabelinskiy V.I., Fedotov A.G., Kazatchkina N.I., Kapanadze G.D. Laser spectral fluorescent colposcope: pre-clinical testing on the experimental tumor model // *Biomedicine*. – 2013. – № 2. – P. 108-122.
5. Burmistrova N.A., Kolontaeva O.A., Rusanova T.Yu., Inozemtseva O.A., Suetenkov D.E., Gorin D.A. Core-shell structures and polyelectrolyte capsules with immobilized acid-base indicators // *Bulletin of the Saratov University*. – 2013. – Vol.13, №. 4. – P. 5-12.

6. Gelfond M.L. Photodynamic therapy in oncology // *Practical Oncology*. – 2007. – Vol. 8, № 4. – P. 204-210.
7. Genina E.A., Bashkatov A.N., Kochubey V.I., Tuchin V.V., Al'tshuler G.B. In vivo researches of the interaction the indocyanine green with human epidermis // *Letters to the Journal of Technical Physics*. – 2001. – Vol. 27, issue 14. – P. 63-67.
8. Golovina G.V., Novikov F.N., Ol'shevskaya V.A., Kalinin V.N., Shtil' A.A., Kuz'min V.A. Constants of complexforming Zn-, Ni- and Pd-derivatives of purpurin-18 with serum albumin // *Journal of Physical Chemistry*. – 2012. – Vol. 86, № 11. – P. 1887-1889.
9. Goryainov S.F., Potapov A.A., Gol'bin D.A., Zelenkov P.V., Kobyakov G.L. .. Fluorescent diagnostics and laser biospectroscopy as one of the methods of multi-modal navigation in neurosurgery // *Questions of Neurosurgery*. – 2012. – № 6. – P. 57-65.
10. Dobretsov G.E. Fluorescent Probes in the study of cells, membranes and lipoproteins. – M.: Nauka, 1989. – 277 p.
11. Katznel'son L.A., Lysenko V.S., Bol'shanskaya G.I. Clinical atlas of pathology the ocular fundus. – M.: GEOTAR Media, 2013. – 120 p.
12. Kotlyar K.E., Drozdova G.A., Shamshinova A.M. Hemodynamics of the eye and modern methods of its investigation // *Glaucoma*. – 2006. – № 4. – P.71-77.
13. Krasovitsky B.M., Bolotin B.M. Organic luminophors. – Len. Dep.: Chemistry, 1976. – 976 p.
14. Kudinova N.V., Berezov T.T., Photodynamic therapy of cancer: the search for the ideal photosensitizer // *Biomedical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55, Issue 5. – P. 558-569.
15. Kuznetsov V.V. Determination of pH // *Soros Educational Journal*. – 2001. – Vol. 7, № 4. – P. 44-50.
16. Lakovich J. Basics of the fluorescent spectroscopy. – M.: Mir, 1986. – 496 p.
17. Lukyanets E.L. Search for new photosensitizers for photodynamic therapy // *Photodynamic therapy and Photodiagnostics*. – 2013. – № 3. – P. 3-16.
18. Lisovskiy V.A., Schedrunov V.V., Barskiy I.Ya. Luminescent analysis in gastroenterology. – L.: Nauka, 1984. – 236 p.
19. Lobanok E.S., Vasilevich I.B., Vorobey A.V. Induced 5-ALA porphyrin accumulation in the cells of the blood system // *Biomedical Chemistry*. – 2011. – Vol. 57, Issue 2. – P. 195-200.
20. Loshchenov V.B., Stratonnikov A.A. Physical basis of fluorescent diagnosis and photodynamic therapy // *Collection of papers MIFI*. – 2000. – Vol. 4. – P. 53-54.
21. Patoka E.Yu., Kharnas S.S., Zavodnov V.Ya, Alitsov Yu.A., Rybin V.K., Kogan E.A., Zavrazhina I.N., Karimova L.N., Berezin A.N., Loshchenov V.B. Study of fluorescence spectra ALA-induced PP IX of peripheral tumors in vivo // *Electronic Journal «Investigated in Russia»*. – 2003. – № 6. – P.1527-1536. URL: <http://zhurnal.ane.relarn.ru/articles/2003/129.pdf> (request data: 30.07.2003).
22. Prieszhev A.V., Tuchin V.V., Shubochkin L.P. Laser diagnostics in biology and medicine. – M.: Nauka, 1989. – P. 240.
23. Reshetnikov A.V., Shvets V.I., Ponomarev G.V. Water-soluble tetrapyrrole photosensitizers for photodynamic therapy of cancer // *Russian Chemical porphyrins*. – SPb.: Research Institute of Chemistry, St. Petersburg State University. – 1999. – Vol. 2, Chapter 4. – P. 70-114.
24. Rogatkin D.A., Bychenkov O.A., Lapaeva L.G. Accuracy, reliability and interpretation of the results in vivo laser-fluorescent diagnostics in the spectral range of fluorescence of endogenous porphyrins // *Optical Journal*. – 2009. – № 11. – P. 46-53.
25. Sorokina K.N., Tulupov A.A., Tolstikova T.G., Usov V.Yu. Modern approaches to the creation of contrast agents for magnetic resonance tomography diagnostics // *Bulletin of the Siberian Medicine*. – 2011. – № 6. – P. 79-85.
26. Tuchin V.V. Lasers and fiber optics in biomedical research. – M.: Phymathlit, 2010. – 488 p.
27. Udartseva O.O., Andreeva E.R., Buravkova A.B. Accumulation of photosens and protoporphyrin in different cells of mesenchymal origin // *Cell Techniques in Biology and Medicine*. – 2013. – № 2. – P. 102-106.
28. Filonenko E.V. The history of the development of fluorescent diagnosis and photodynamic therapy and its abilities in oncology // *Russian Chemical Journal*. – 2013. – Vol.12, № 2. – P. 1-12.
29. Hayman Kh., Kel'ner U., Ferster M. Atlas of ocular fundus angiography / ed. Astakhov Yu.S., Lisochnikina A.B. – M.: MEDpress-Inform, 2008. – 192 p.
30. Chernitskiy E.A., Slobozhanina E.I. Spectral luminescent analysis in medicine. – M.: Science and Technology, 1989. – 140 p.
31. Alander I., Kaartinen I., Laakso A., Valisnu P. Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery // *International Journal of biomedical Imaging*. – 2012. – Vol.2012, № 7. – P. 1-7.
32. Andersson-Engels S., Klinberg C., Svanberg K., Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics // *Physics medicine and biology*. – 1998. – № 42. – P. 815-824.
33. Berezin M, Guo K. Near-infrared fluorescence lifetime pH-sensitive probes // *Biophysical Journal*. – 2011. – Vol. 100, № 8. – P. 2063-2072.
34. Bigio I, Mourant J. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* – 1997. – № 42. – P. 803-814.
35. Biran I, Yu X., Walt D. Optrode – based fiber optic biosensors.-Elsevier. *Optical biosensors Today and Tomorrow*, 2008. – P. 3-83.
36. Borisov S.M., Wolfbeis O., *Optical biosensors // Cemical reviews*. – 2008. – № 108. – P. 423-461.
37. Ferrari L., Rovati L., Fabbri P., Pilati F. Disposable Fluorescence Optical pH Sensor for Near Neutral Solutions // *Sensors*. – 2013. – № 13. – P. 484-499.
38. Han J., Burgess K. Fluorescent indicators for intracellular pH // *American chemical society*. – 2009. – № 30. – P. A-T.
39. Hilderbrand S.A., Weissleder R. Near-infrared fluorescence: applications to in vivo molecular imaging // *Current opinion in chemical biology*. – 2010. – № 14. – P. 71-79.

40. Jnarranz A., Jaen P., Sanz-radriges F., Cuevas J., Gonzales S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications // Clin. Transl oncology. – 2008. – № 10. – P. 148-154.

41. Kim H., Jeong Y., Heo J., Rhu J., Hwang K. A wide – range luminescence pH sensor based on ruthenium (II) complex // Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2009. – Vol. 30, № 3. – P. 539-540.

42. Kobayashi H., Ogawa M., Alford R., Choyke P., Urano Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging // Chemical Reviews. – 2010. – № 5. – P. 2620-2640.

43. Korostynska O., Arshak K, Gill E. Arshak A. Materials and techniques for in vivo pH monitoring // Ieee sensors Journal. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 20-28.

44. Leblond F., Davis S.C., Valdes P.A., Pogue B.W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications // Journal of photochemistry and photobiology. – 2010. – № 98. – P. 77-94.

45. Liebsch G., Klimant J, Krause C., Wolfbeis O. Fluorescent imaging of pH with optical sensor using time domain dual lifetime referencing // Anal. Chem. – 2001. – № 73. – P. 4354-4363.

46. Lobnik A., Oehme I., Murkovic I., Wolfbeis O. pH optical sensors based on sol-gels: chemical doping versus covalent immobilizations // Analytica chemical acta. – 1998. – № 367. – P. 159-167.

47. Mathejczyk J. E. Spectroscopically well-characterized RGD optical probe as a prerequisite for lifetime-gated tumor imaging // Mol. Imaging. – 2011. – № 6. – P. 469-480.

48. Meier R.J., Schreml S., Wang X., Landthaler M., Babilas P., Wolfbeis O.S. Simultaneous photographing of oxygen and pH in vivo using sensor film // Angewandte chemie. – 2011. – Vol. 50, № 11. – P. 10893-10896.

49. Merian J., Gravier J. Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: From preclinical validations to clinical translations // Molecules. – 2012. – № 17. – P. 5564-5591.

50. Nguyen O.T., Tsien R. Y. Fluorescence - guided surgery with live molecular navigation – a new cutting edge // Nature reviews cancer. – 2013. – № 13. – P. 1-10.

51. Quek C., Leong K. Near-Infrared fluorescent nanoprobe for in vivo optical imaging // Nanomaterials. – 2012. – № 2. – P. 92-112.

52. Robertson T, Bunel F, Roberts M. Fluorescein derivatives in intravital fluorescence Imaging // Cells. – 2013. – № 2. – P. 591-606.

53. Schreml S., Meier R., Wolfbeis O., Landthaler M., Szeimies R., Babilas P. 2D luminescence imaging of pH in vivo // PNAS. – 2011. – Vol. 108, № 6. – P. 2432-2437.

54. Stich M., Fischer L.H., Wolfbeis O.S. Multiple fluorescent chemical sensing and imaging // Chem. Soc. Rev. – 2010. – Vol. 39, № 8. – P. 102-114.

55. Tang B., Yu F., Li P., Tong L., Duan X., Xie T., Wang X. A Near-infrared neutral pH fluorescent probe for monitoring minor pH changes // American chemical society. – 2009. – № 131. – P. 3016-3023.

56. Van den Berg N.S., van Leeuwen W.B., van der Poel H.G. Fluorescence guidance in urologic surgery // Current opinion. – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 109-120.

57. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wanczyk K, Golab J. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer // Molecules. – 2011. – № 16. – P. 4140-4164.

58. Wang R., Yu C. Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells // Trends in Analytical Chemistry. – 2010. – Vol. 29, № 9. – P. 1004-1013.

59. Wolfbeis O. Chemical sensing using indicator dyes // Optical fiber sensors. – 1997. – Vol. 4, chap. 8. – P. 53-107.

60. Zhang L, Fang Y, Fang Y. Enhancement techniques for improving 5-aminolevulinic acid delivery through the skin // Dermatologica sinica. – 2011. – № 29. – P. 1-7.

Сведения об авторах

Лычковская Елена Викторовна – старший преподаватель кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: lychk-elena@mail.ru.

Вайс Елизавета Федоровна – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: vaisilya@mail.ru.

Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патофизиологии, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 660022, г. Красноярск, ул. П. Железняк, г. 1; тел. 8(391) 2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.

Салмин Владимир Валерьевич – доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики, ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ.

Адрес: 100106, г. Красноярск, ул. Карла Маркса г. 124; тел. 8(391) 2217472; e-mail: vsalmin@gmail.ru.

Authors

Lychkovskaya E. V. – Senior Lecturer of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical & Toxicological Chemistry of Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, P. Zheleznyak Street, Krasnoyarsk, RF, 660022; tel.: 8 (391) 2280769; e-mail: lychk-elena@mail.ru.

Vise E. F. – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with the Course of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, P. Zheleznyak Street, Krasnoyarsk, RF, 660022; Phone: 8 (391) 2280769; e-mail: vaisilya@mail.ru.

Salmina A. B. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Department of Biological Chemistry with the Course of Medical Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 1, P. Zheleznyak Street, Krasnoyarsk, RF, 660022; Phone: 8 (391) 2280769; e-mail: allasalmina@mail.ru.

Salmin V. V. – Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Medical & Biological Physics of Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky, Ministry of Health of the Russian Federation.

Address: 124, K. Marx Street, Krasnoyarsk, RF, 660021; Phone: 8 (391) 2217472; e-mail: vsalmin@gmail.