

# Лазер-индуцированная аутофлуоресценция для оценки метаболизма и гемодинамики ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.Б. Салмина, В.В. Салмин, О.В. Фролова, Д.И. Лалетин, М.А. Фурсов, Д.П. Скомороха, А.А. Фурсов, М.А. Кондрашов, Н.Н. Медведева, Н.А. Малиновская, Н.С. Манторова

*НИИ молекулярной медицины и патофизиологии;  
ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;  
ИИФиРЭ ФГАОУ СФУ (Красноярск)*

*В статье представлены результаты экспериментального исследования возможности применения метода лазерно-флуоресцентного анализа для оценки метаболизма ткани головного мозга in situ при сохранении целостности твердой мозговой оболочки. На модели аноксии и острой ишемии головного мозга продемонстрирована информативность метода регистрации флуоресценции восстановленных пиридиновых нуклеотидов и оценки индекса жизнеспособности, учитывающего конверсию окси- и дезоксиформ гемоглобина. Изучены некоторые патофизиологические механизмы изменения пула пиридиновых нуклеотидов при аноксии и ишемии.*

**Ключевые слова:** головной мозг, аутофлуоресценция, пиридиновые нуклеотиды

В числе обозначенных в конце 90-х годов 20-го столетия наиболее перспективных направлений развития нейронаук, имеющих высокий потенциал для внедрения в медицинскую практику [22], проблема создания новых технологий визуализации мозга занимает одно из центральных мест, что актуально для развития как фундаментальных исследований, так и клинической практики в этой области. Так, например, в нейрохирургической практике и при использовании экспериментальных моделей неврологической патологии актуален как интраоперационный, так и послеоперационный нейромониторинг, по возможности, минимально инвазивный, с использованием чувствительных и специфичных маркеров. Нейромониторинг на сегодняшний день может включать в себя транскраниальное доплеровское исследование, электроэнцефалографию [16], транскраниальную оксиметрию [23], церебральный микродиализ [7], а также регистрацию в ликворе или периферической крови уровней биохимических маркеров патологических процессов в мозге (креатинкиназа ВВ, белок S100, GFAP, NSE и др.). Несмотря на такое разнообразие подходов к решению проблемы нейромониторинга, большая часть из перечисленных методов имеет свои минусы, обусловленные их недостаточной специфичностью, высокой стоимостью, необходимостью дополнительной дифференцировки индикаторов физиологической и патологической активности мозга, а также необходимостью осуществления мультимодального наблюдения для повышения точности интерпретации регистрируемых параметров.

Регистрация аутофлуоресценции ткани головного мозга — один из информативных способов оценки интегральных метаболических параметров функционирования в норме и при патологии *in vivo* [21, 22]. Основной вклад в аутофлуоресценцию клеток головного мозга вносят восстановленные пиридиновые нуклеотиды (НАД(Ф)Н) и окисленные

флавиновые нуклеотиды (ФАД). По динамическим изменениям сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н можно судить о развитии гипоксически-ишемического поражения головного мозга, сопровождающегося увеличением пула восстановленных нуклеотидов из-за отсутствия кислорода как конечного акцептора электронов в дыхательной цепи [12]. В то же время изменения флуоресценции ФАД отражают состояние нейрональной активности, сопряженной с увеличением внутриклеточной концентрации кальция, интенсификацией процессов трансмембранного транспорта кальция в митохондриях и увеличением пула окисленных флавопротеинов [15, 20].

В целом, признается, что мониторинг НАД(Ф)Н аутофлуоресценции в коре головного мозга отражает функциональную активность митохондрий и может быть использован для оценки энергетического метаболизма головного мозга и изолированных клеток нейрональной и глиальной природы [17].

Существенной проблемой применения методов нейровизуализации, базирующихся на регистрации сигнала аутофлуоресценции головного мозга, является возможность корректной интерпретации полученных данных с учетом параметров микроциркуляции и специфических для мозга механизмов поддержания уровня восстановленных и окисленных форм пиридиновых нуклеотидов в ткани. На модели метаболической аноксии *in vitro* [14] было показано, что изменения флуоресценции НАД(Ф)Н различны в клетках нейрональной и глиальной природы: увеличение флуоресценции в обоих типах клеток сменялось снижением интенсивности флуоресценции в нейронах, но не астроцитах. Принимая во внимание молекулярные механизмы нейронастроглиального метаболического сопряжения и глиоваскулярного контроля, во многом контролируемые локальными концентрациями НАДН и лактата в ткани мозга

[5, 6], оценка гемодинамических и метаболических изменений при нейрональной активности или повреждении мозга является сложной методической задачей.

Известно, что астроциты после захвата глутамата, высвобождающегося в межклеточное пространство при нейрональной активности, продуцируют лактат, который утилизируется нейронами в качестве энергетического субстрата, и эти события соответствуют изменениям отношения НАДН/НАД<sup>+</sup> в клетках астроглиальной и нейрональной природы [3, 4]. В условиях гипоксии накопление НАДН в цитозоле клеток является основным признаком активации анаэробного гликолиза, а в митохондриях — признаком дисфункции электронтранспортной цепи. НАДН/НАД<sup>+</sup> в митохондриях определяет интенсивность окисления пирувата и жирных кислот, тогда как НАДН/НАД<sup>+</sup> в цитозоле модулирует интенсивность метаболизма лактата [24]. С другой стороны, увеличение клетками нейрональной и глиальной природы продукции лактата и НАДН (как это происходит при физиологической стимуляции и при гипоксии/ишемии) стимулирует увеличение локального кровотока [13]. Это определяет потребность в дифференцированной оценке изменения аутофлуоресценции НАД(Ф)Н в ткани мозга, которое в равной степени может быть спровоцировано изменением метаболизма клеток или изменением регионарного кровотока и гашением аутофлуоресценции НАД(Ф)Н гемоглобином крови [10].

Ранее мы продемонстрировали возможность использования метода лазерно-флуоресцентной оптической биопсии миокарда для оценки его ишемического повреждения *in situ* [2]. Целью настоящего экспериментального исследования стала оценка информативности метода лазерно-флуоресцентной оптической биопсии для анализа метаболического и гемодинамического статуса головного мозга при ишемии и аноксии.

## Материалы и методы

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все экспериментальные процедуры выполнялись с соблюдением этических принципов работы с лабораторными животными.

Для моделирования острой аноксии и ишемии головного мозга у животных (n=15) под ингаляционным наркозом фторотаном (вводный — 4,8 об%, поддерживающий — 1,9 об% при подаче кислорода 4 л/мин) использовали метод пережатия трахеи и билатеральной окклюзии общих сонных артерий, соответственно. Эксперименты выполнены с использованием стереотаксической рамки (Narishige, Япония). Для размещения оптического зонда был произведен полулунный разрез в левой теменной области головы крысы, выполнено 4 трепанационных отверстия, произведена резекционная трепанация черепа, на расстоянии 0,6 см от поверхности твердой мозговой оболочки установлен датчик для оптической биопсии. Пережатие трахеи или лигирование артерий производилось через 10 минут после установки оптического зонда.

Аутофлуоресценция ткани мозга регистрировалась *in situ* с помощью экспериментального лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения [1, 18]. Мониторинг состояния тканей мозга осуществлялся путем многократной записи спектров люминесценции твердой

мозговой оболочки при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 337 нм. Лазерное излучение направлялось по каналу возбуждения до объекта с помощью кварцевого волокна длиной 2 м и диаметром сердцевины 400 мкм. Излучение люминесценции улавливалось торцом второго оптического волокна и направлялось в канал регистрации (монокроматор). Торцы обоих волокон смонтированы в общей оптической головке-зонде, которая устанавливалась на расстоянии 8–10 мм над исследуемым полем. Диаметр облучаемой зоны при этом не превышал 5 мм. Перемещение зонда в координатных направлениях XYZ осуществлялось с помощью манипулятора стереотаксической рамки. Общее время мониторинга составляло 20 минут.

Спектры люминесценции регистрировались в интервале 390–560 нм с шагом 10 нм. Среднее время однократной записи одного спектра составляло 20 с. При этом данные по интенсивности люминесценции в каждой точке спектра получали путем усреднения по 1000 измерениям. При записи спектров учитывалась интенсивность фонового сигнала, значение которой получали путем усреднения данных с АЦП в межимпульсный период. Обработка полученных спектров осуществлялась по следующему алгоритму. Все спектры нормировались на среднее значение интенсивности люминесценции в выбранном интервале.

$$i(\lambda_k, t_m) = N \frac{I(\lambda_k, t_m)}{\sum_{k=1}^N I(\lambda_k, t_m)}$$

где  $I(\lambda_k, t_m)$  — ненормированный спектр, снятый в момент времени  $t_m$ .

Указанная процедура позволяла учесть общее изменение сигнала люминесценции из-за неконтролируемого высыхания поверхности твердой мозговой оболочки, а также долговременных вариаций мощности лазерного излучения, лежащих в пределах 5%. Далее вычислялся средний спектр до (0–10 мин) и после начала острой аноксии или ишемии (10–20 мин), а также разностный спектр. Значение длины волны, соответствующее изобестической точке разностного спектра, составило 450 нм, ближайшего максимума — 430 нм, минимума — 470 нм. Средний разностный спектр по выборке представлен на рис. 1.

Гомогенизация образцов ткани коры головного мозга, полученных от контрольных ложно-оперированных животных,

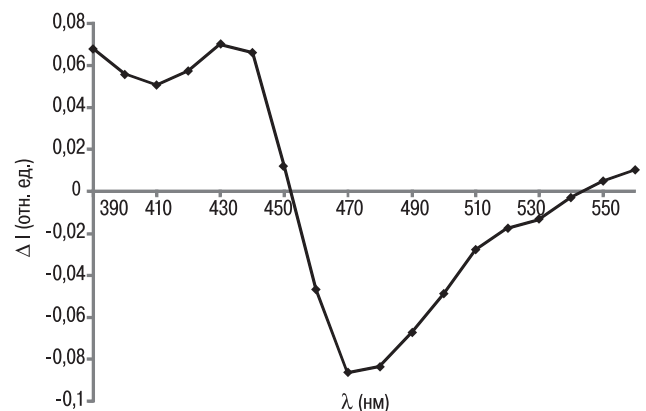


рис. 1: Средний нормированный разностный спектр люминесценции твердой мозговой оболочки крысы при острой аноксии.

а также от животных экспериментальных групп через 10 минут после индукции острой аноксии или ишемии, осуществлялась при 4°C с использованием гомогенизатора Silent Crusher M, в полученном гомогенате определялась концентрация белка по стандартному протоколу (MicroLowry test, Sigma, USA). Суммарная НАД(Ф)Н-оксидантная активность измерялась в гомогенате ткани коры (лобная и затылочная области) с использованием кинетики флуоресценции (спектрофлуориметр SOLAR SM2203, Беларусь) при возбуждении флуоресценции на длине волны 340 нм и выражалась в единицах активности на миллиграмм белка ткани. Концентрация лактата в гомогенате ткани коры (лобная и затылочная области) измерялась методом, основанном на дегидрировании лактата в присутствии лактатдегидрогеназы и НАД<sup>+</sup> со спектрофотометрической регистрацией количества образовавшегося НАДН. В состав реакционной смеси входили гомогенат ткани, 1 М глициновый буфер (pH 9,5), 0,56 М гидразина сульфат (pH 8,6), 0,1 М НАД<sup>+</sup> (pH 6,75), через 5 минут (после перемешивания) при +37°C добавляли 2,7 единиц/мкл лактатдегидрогеназы, спектрофотометрически измеряли поглощение при 340 нм, по калибровочному графику определяли концентрацию лактата (ммоль/г).

Оценка ферментативной активности АДФ-рибозилициклазы/CD38 в гомогенате ткани коры (лобная и затылочная области) осуществлялась флуориметрическим методом с использованием флуорогенного субстрата – никотинамидгуанидинуклеотида (НГД) согласно стандартному протоколу путем инкубации 100 мкл гомогената ткани с реакционной смесью, содержащей 100 мкм НГД в 20 мМ трис-НСl (pH 7,4) в течение 20 минут при 37°C. Регистрация флуоресценции супернатанта осуществлялась на 0-й и 20-й минутах инкубации на спектрофлуориметре SM2203 (Solar, Belarus) при длине волны возбуждения 300 нм и длине волны испускания 410 нм. Активность фермента вычислялась по разнице амплитуды флуоресценции на 20-й и 0-й минутах инкубации, отнесенной к миллиграмму белка ткани в минуту.

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики и проверки статистических гипотез с использованием программ StatPlus 2006 Professional Сборка 3.9.0.0, Statistica 6.0 и пакета анализа программы MS Excel 2002. В пределах каждой выборки определяли нормальность распределения, дисперсию, среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение, ошибку среднего. Сравнение средних осуществляли с помощью Т-теста. Проводились ранговые корреляции Спирмена (R). Все результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – ошибка среднего,  $p$  – уровень значимости.

## Результаты

Как и следовало ожидать, индукция аноксии или острой ишемии головного мозга имела своим результатом увеличение флуоресценции НАД(Ф)Н. При оценке разностного спектра флуоресценции твердой мозговой оболочки (рис. 1) мы отметили, что пик с длиной волны 430 нм соответствует пику полосы Соре дезоксигемоглобина, а минимум 470 нм соответствует положению максимума люминесценции НАД(Ф)Н. На разностном спектре также наблюдается слабо выраженный минимум на длине волны 410 нм, соответствующей положению пика полосы Соре оксигемоглобина.

Кинетические изменения в спектре люминесценции, вызванные аноксией, анализировались с помощью отношения интенсивностей люминесценции  $C_{\text{Нб}} = I_{430}/I_{450}$ , которое интерпретировалось как изменение относительного уровня дезоксигемоглобина,  $C_{\text{НАДН}} = I_{470}/I_{450}$ , которое интерпретировалось как изменение относительного уровня НАД(Ф)Н. Кроме того, нами оценивалось отношение

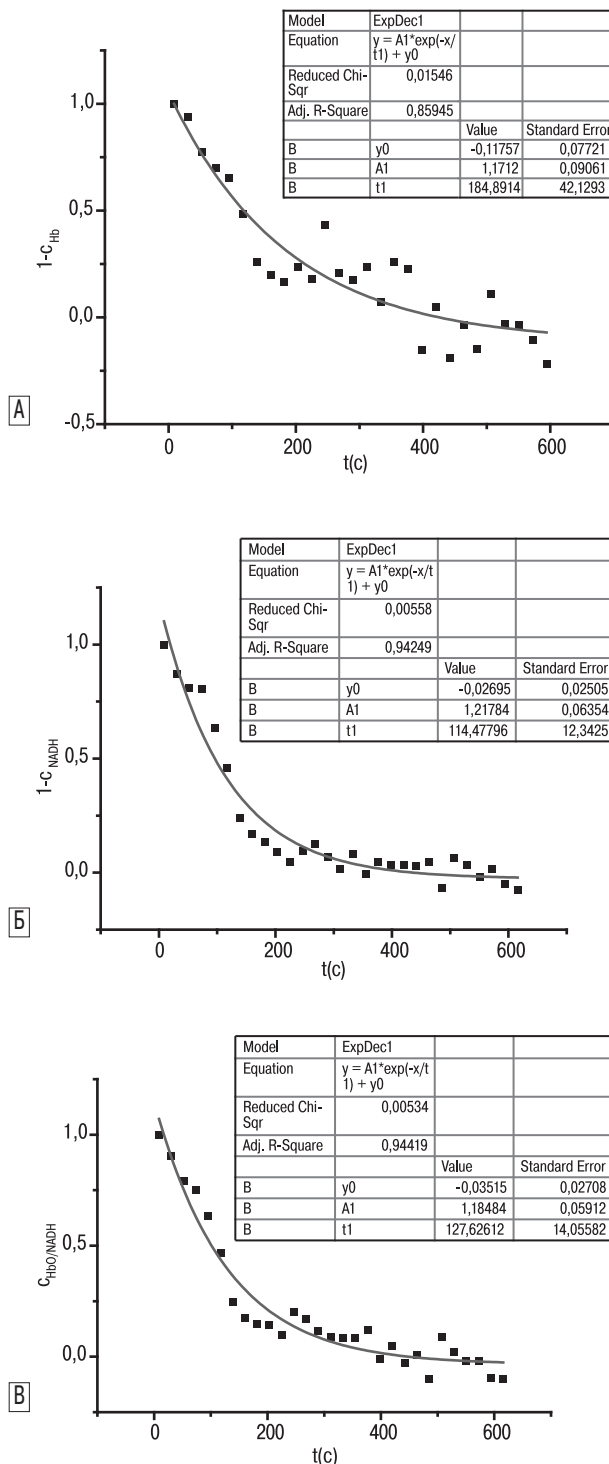


рис. 2: Динамика изменения при острой аноксии в интервале 0–10 мин: А – относительного уровня дезоксигемоглобина, Б – НАД(Ф)Н, В – индекса жизнеспособности клеток головного мозга.

I470/I430, которое трактуется как индекс жизнеспособности ткани. Нами произведено сравнение кинетики для указанных параметров после усреднения соответствующих кинетических кривых по выборке животных, подвергшихся острой аноксии. Причем указанные соотношения нормировались таким образом, чтобы в начале аноксии их уровень составил 1, а к 10-минутному моменту — 0:

$$c_{\alpha}(t) = \frac{C_{\alpha}(t) - C_{\alpha}(10)}{C_{\alpha}(0) - C_{\alpha}(10)}$$

Средние кинетические кривые для нормированных указанных параметров представлены на рис. 2.

Как видно из приведенных графиков, налицо достоверное различие в кинетических константах, отвечающих за изменение пула гемоглобина  $t_{Hb}=185\pm42$  с и пиридиновых нуклеотидов  $t_{NADH}=114\pm12$  с. Интересно, что изменения в системе НАД(Ф)Н проявляются раньше, чем в системе гемоглобина. Индекс жизнеспособности имеет близкую к  $t_{NADH}$  постоянную времени  $t_{HbO/NADH}=128\pm14$  с для общего периода аноксии, не имеющую достоверных отличий. Коэффициент корреляции между выборками значений относительного уровня НАД(Ф)Н ткани и индекса жизнеспособности в пределах интервала времени аноксии, равного удвоенной постоянной времени изменения пула гемоглобина  $t=370$  с, не хуже  $R=0,995$ .

Нами также произведен детальный анализ кинетики изменения пула гемоглобина, НАД(Ф)Н и индекса жизнеспособности в пределах интервала времени, равного постоянной времени изменения пула гемоглобина. Зависимости логарифма изменения рассматриваемых величин от времени представлены на рис. 3. Из приведенных диаграмм следует двухэкспоненциальный характер изменения пула НАД(Ф)Н и гемоглобина в начальной стадии аноксии. Анализ этих изменений дает право утверждать, что процесс изменения пула гемоглобина и НАД(Ф)Н носит бифазный характер и состоит из начальной медленной фазы длительностью примерно 100 с и последующей быстрой фазы с такой же длительностью. Данные по постоянным времени, вычисленным по значениям параметров линий тренда для рассматриваемых параметров, представлены в табл. 1. При малой продолжительности аноксии постоянные времени для гемоглобина и НАД(Ф)Н имеют схожие значения, однако погрешность определения кинетических констант при использовании параметра (индекс жизнеспособности) оказалась меньше, что указывает на более высокую чувствительность этого параметра в оценке динамики аноксии. С учетом меньшей общей постоянной времени для индекса жизнеспособности, по сравнению с константой для гемоглобина, предлагаемый индекс оправдан для

таблица 1: Постоянные времени изменения пула гемопротеидов и пиридиновых нуклеотидов головного мозга при аноксии

|           | Нб                   | НАД(Ф)Н              | Нб/НАД(Ф)Н           |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| $t_1$ , с | 189±19<br>(ΔC/C=10%) | 220±42<br>(ΔC/C=19%) | 200±16<br>(ΔC/C=8%)  |
| $t_2$ , с | 59±7<br>(ΔC/C=12%)   | 53±5<br>(ΔC/C=9%)    | 55,5±6<br>(ΔC/C=11%) |

оценки гипоксических изменений метаболизма и гемодинамики в ткани головного мозга.

При билатеральной окклюзии общих сонных артерий (модель острой ишемии) мы оценили динамику интенсивности люминесценции на длинах волн 430 нм и 470 нм и построили нормированные кинетические кривые для индекса жизнеспособности ткани. На рис. 4 представлена средняя диаграмма нормированного индекса жизнеспособности для ишемии головного мозга в сравнении с аналогичными показателями при аноксии. Достоверные отличия указанных кинетических кривых наблюдаются до момента, соответствующего постоянной времени изменения пула гемоглобина в случае аноксии. Полученная постоянная времени для ишемии составляет 20 с, что совпадает с временем однократного прохода монохроматора при записи спектра.

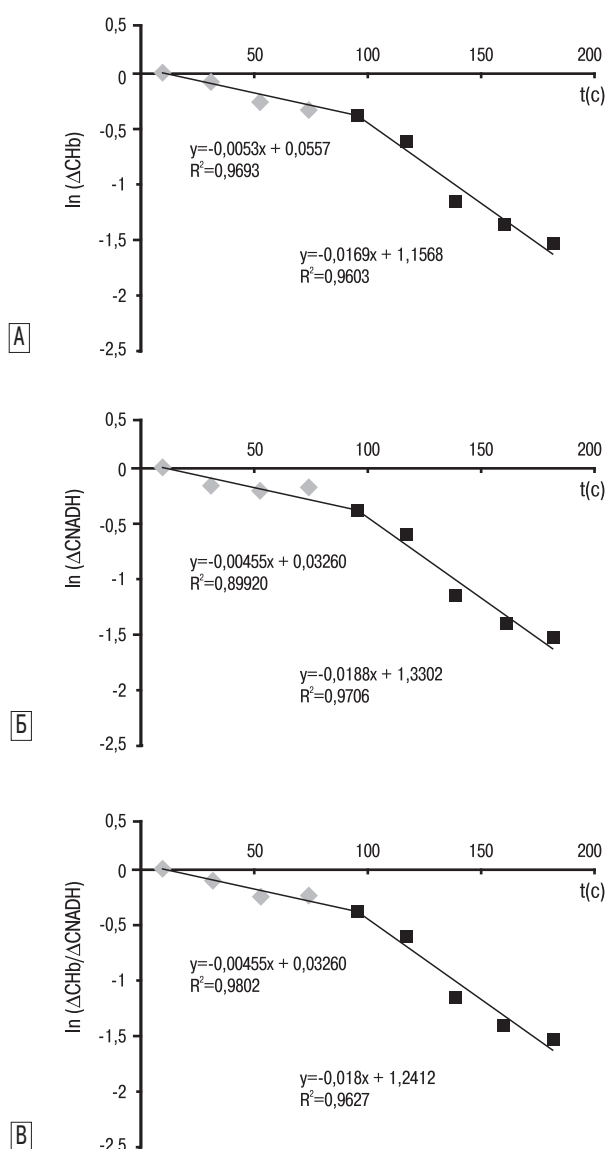


рис. 3: Динамика изменения логарифмов относительного уровня дезоксигемоглобина (А), НАД(Ф)Н (Б) и индекса жизнеспособности клеток головного мозга (В) от длительности острой аноксии в интервале 0–3 мин.

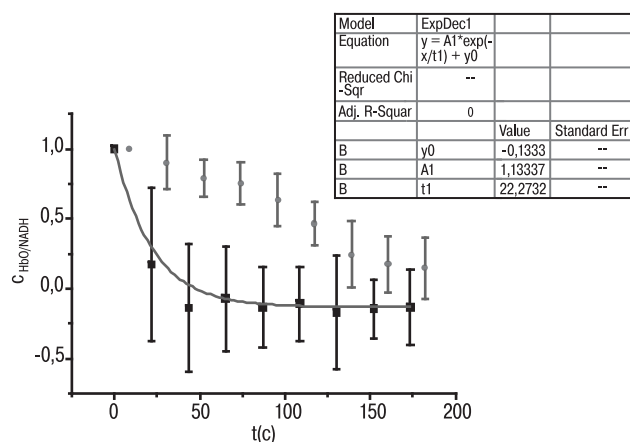


рис. 4: Динамика индекса жизнеспособности при аноксии (серый цвет) и ишемии (черный цвет) головного мозга.

Для оценки патофизиохимических изменений в ткани головного мозга при ишемии и аноксии мы использовали определение уровня лактата (рис. 5). Мы обнаружили, что концентрация лактата достоверно увеличивалась лишь в лобной области коры головного мозга крыс, перенесших аноксию или острую ишемию.

Суммарная активность НАД(Ф)Н-оксидаз в ткани мозга отражает особенности протекания процессов, утилизирующих восстановленные пиридиновые нуклеотиды, что приобретает особое значение при гипоксически-ишемическом поражении. Для оценки вклада этих процессов в изменение пула НАД(Ф)Н мы проанализировали активность НАД(Ф)Н-оксидаз в лобной и затылочной областях коры головного мозга крыс при аноксии, в динамике ишемии (рис. 6). Активность НАД(Ф)Н-оксидаз в ткани головного мозга достоверно уменьшалась уже после 10 минут острого поражения и оставалась на таком уровне вплоть до 60 минут ишемии.

Известно, что важным механизмом контроля энергетического гомеостаза клеток является транспортировка НАД<sup>+</sup>, генерируемого в результате работы дыхательной цепи, из митохондрий в цитозоль, где он необходим для протекания реакций гликолиза и работы НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов (АДФ-рибозилтрансфераза, АДФ-рибозилциклаза) [11]. Для оценки этого механизма мы проанализировали активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в коре головного

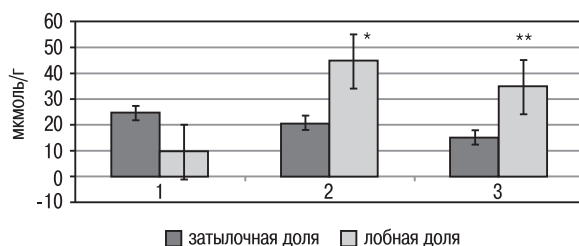


рис. 5: Изменение уровня лактата в ткани головного мозга при аноксии и острой ишемии.

1 – контрольная группа, 2 – аноксия, 3 – острая ишемия.

Примечание: p – уровень значимости, Тест Уилкоксона: \* $p_{1-2} \leq 0,01$ , \*\* $p_{1-3} \leq 0,05$ .

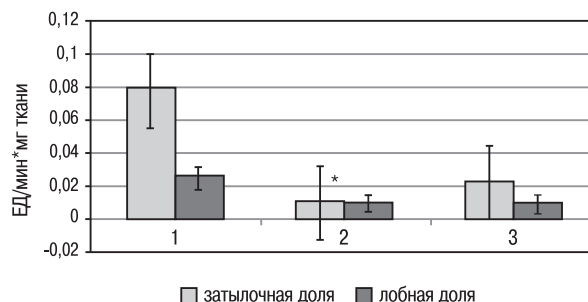


рис. 6: Изменение НАД(Ф)Н – оксидазной активности в клетках коры головного мозга при аноксии и ишемии.

1 – контрольная группа, 2 – аноксия, 3 – острая ишемия головного мозга.

Примечание: p – уровень значимости Тест Уилкоксона: \* $p_{1-2} \leq 0,01$ .

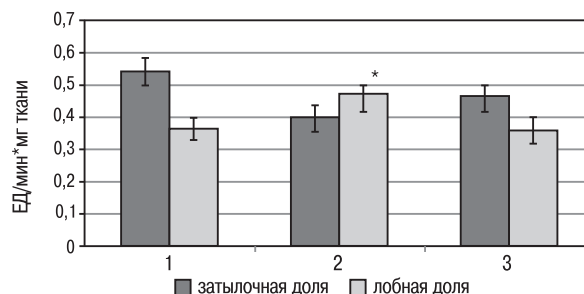


рис. 7: Активность АДФ – рибозилциклазы/CD38 в ткани головного мозга.

1 – контрольная группа, 2 – аноксия, 3 – острая ишемия.

Примечание: p – уровень значимости, Тест Уилкоксона: \* $p_{1-2} \leq 0,03$ .

мозга крыс (рис. 7). Активность фермента достоверно возросла только в лобной области коры головного мозга при аноксии, что соответствовало региону мозга, в котором было зарегистрировано увеличение уровня лактата.

## Обсуждение результатов

Результаты нашей работы демонстрируют возможность регистрации метаболических и гемодинамических изменений в ткани головного мозга методом оценки лазер-индуцированной аутофлуоресценции без нарушения целостности твердой мозговой оболочки. Мы установили, что использование в качестве доминирующего тканевого флуорофора НАД(Ф)Н, концентрация которого в ткани характеризует не только степень нарушения энергетического метаболизма, но и особенности реализации механизмов нейрон-астроглиального метаболического сопряжения и гемоваскулярного контроля, имеет диагностическую ценность только в том случае, если одновременно оценивается влияние основных гемопротеидов в системе (дезоксигемоглобин) на параметры аутофлуоресценции.

Применение интегрального показателя – индекса жизнеспособности, характеризующего отношение интенсивности флуоресценции гемоглобина и НАД(Ф)Н – позволило нам увеличить достоверность и информативность метода регистрации параметров энергетического метаболизма ткани головного мозга с помощью лазерно-флуоресцентного анализа. Принимая во внимание тот факт, что сложность адекватной интерпретации данных оптической биопсии из-за поглощения света гемопротеидами ткани и

крови представляет собой основной лимитирующий фактор для использования этого метода [19], полученные нами результаты формируют новые подходы к интегральной оценке метаболизма и гемодинамики головного мозга *in situ*.

Представляет значительный интерес то, что при аноксии (но не при ишемии) изменение соотношения НАД(Ф)Н/НАД(Ф) существенно опережает по времени изменение соотношения окси- и дезоксигемоглобина. Иными словами, пул пиридиновых нуклеотидов быстрее реагирует на изменение уровня кислорода в ткани. Принимая во внимание то, что потребление тканью кислорода является определяющим фактором для регуляции соотношения НАДН и НАД<sup>+</sup> в митохондриях клеток, тогда как НАД(Ф)Н/НАД(Ф)<sup>+</sup> в цитоплазме в большей степени контролируется интенсивностью гликолиза и НАДФН-утилизирующих процессов окисления и биосинтеза [24], зарегистрированные нами быстрые изменения пула восстановленных пиридиновых нуклеотидов, опережающие конверсию оксигемоглобина в дезоксиформу при аноксии, могут свидетельствовать о доминирующем вкладе цитозольной фракции НАД(Ф)Н в суммарную флуоресценцию ткани мозга.

Дополнительным подтверждением того, что не уровень кислорода в ткани, а интенсивность реакций гликолиза является определяющим фактором в регуляции отношения НАД(Ф)Н/НАД(Ф)<sup>+</sup> в головном мозге, являются наши данные о том, что активность НАД(Ф)Н-оксидазы в ткани мозга драматически снижалась на протяжении всего периода аноксии или ишемии; увеличение концентрации лактата и активности АДФ-рибозилциклазы было избирательно зарегистрировано в лобной, но не затылочной области коры. С учетом особенностей кровоснабжения лобной и затылочной области коры головного мозга крыс, увеличение концентрации лактата только в

лобной части коры, испытывающей значительно больший дефицит кислорода при данной модели острой ишемии, вполне закономерно и объяснимо. Ишемия стимулирует анаэробный гликолиз, увеличивает продукцию лактата, что имеет своим результатом увеличение окисления НАДН в цитозоле [24]. Логично предположить, что в регионе коры, максимально страдающем от ишемии, в клетках с высокой активностью анаэробного гликолиза биодоступность НАД<sup>+</sup> в качестве субстрата для АДФ-рибозилциклазы изменяется. Весьма вероятно, что дополнительным источником НАД<sup>+</sup> для активности АДФ-рибозилциклазы являются митохондрии вследствие индуцированного аноксией или ишемией открытия МРТ-мегаканалов, высвобождающих НАД<sup>+</sup> в цитозоль, где он становится субстратом для НАД<sup>+</sup>-гликогидролазы, подобно тому, как это было ранее зарегистрировано в миокарде в состоянии ишемии [8]. Дополнительно, механизм высвобождения НАДН из митохондрий в цитозоль нейронов был предложен для объяснения причин метаболической несостоятельности клеток нейрональной природы после перенесенной ишемии [9].

Таким образом, регистрация аутофлуоресценции ткани головного мозга без нарушения целостности твердой мозговой оболочки с использованием лазерного излучения с длиной волны 337 нм позволяет оценить интегральные характеристики энергетического обмена и локальной гемодинамики в физиологических условиях, а также при ишемии или гипоксии головного мозга. Использование эндогенной флуоресценции клеток нейрональной и глияльной природы позволяет оценить метаболический статус и идентифицировать некоторые патогенетические моменты, составляющие основу механизма развития патологического процесса в головном мозге. Разработанный метод перспективен для создания новых технологий нейромониторинга в клинической практике.

## Список литературы

1. Попов Ю.А., Салмин В.В., Салмина А.Б. и соавт. Спектрофлуориметрический метод оценки ишемии миокарда. Вестник КрасГУ, серия Физико-математические науки 2005; 4: 89–92.
2. Салмин В.В., Салмина А.Б., Фурсов А.А. и соавт. Использование метода лазерно-флуоресцентной оптической биопсии миокарда для оценки ишемического повреждения. Журнал СФУ 2010 (в печати).
3. Aubert A., Costalat R. Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. J. Cerebr. Blood Flow Metab. 2005; 25: 1476–1490.
4. Aubert A., Costalat R., Magistretti P.J., Pellerin L. Brain lactate kinetics: modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005; 102 (45): 16448–16453.
5. Aubert A., Pellerin L., Magistretti P.J., Costalat R. A coherent neurobiological framework for functional neuroimaging provided by a model integrating compartmentalized energy metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. 2007; 104 (10): 4188–4193.
6. Ciaume C., Koulakoff A., Roux L. et al. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. Nature Rev. Neuroscience 2010; 11: 87–99.
7. De Georgia M.A. Multimodal monitoring in neurocritical care. Cleveland Clin. J. Med. 2004; 71 (Suppl. 1): S16–17.
8. Di Lisa F., Menabo R., Canton M. et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. J. Biol. Chem. 2001; 276: 2571–2575.
9. Fiskum G., Danilov C.A., Mehrabian Z. et al. Postischemic oxidative stress promotes mitochondrial metabolic failure in neurons and astrocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1147: 129–138.
10. Foster K.A., Galeffi F., Gerich F.J. et al. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. Progress in Neurobiol. 2006; 79: 136–171.
11. Higashida H., Salmina A.B., Olovyanikova R.Ya., Hashii M. Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system. Neurochem. Int. 2007; 51(2–4): 192–199.
12. Higuchi T., Takeda Y., Hashimoto M. et al. Dynamic changes in cortical NADH fluorescence and direct current potential in rat focal ischemia: relationship between propagation of recurrent depolarization and growth of the ischemic core. J. Cerebr. Blood Flow Metab. 2002; 22 (1): 71–79.
13. Ido Y., Chang K., Woolsey T.A., Williamson J.R. NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues. FASEB J. 2001; 15: 1419–1421.

14. Kahraman S., Fiskum G. Anoxia-induced changes in pyridine nucleotide redox state in cortical neurons and astrocytes. *Neurochem. Res.* 2007; 32 (4–5): 799–806.
15. Kosterin P., Kim G.H., Muschol M. et al. Changes in FAD and NADH fluorescence in neurosecretory terminals are triggered by calcium entry and by ADP production. *J. Membr. Biol.* 2005; 208 (2): 113–124.
16. Kulik A., Rodriguez R.A., Nathan H.J., Ruel M. Intraoperative neuromonitoring in cardiac surgical patients with severe cerebrovascular disease. *Can. J. Anaesth.* 2005; 52 (3): 335–336.
17. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292: C615–C640.
18. Provorov A.S., Salmin V.V., Salmina A.B. et al. Pulsed gas lasers with longitudinal discharge and their application in medicine. *Laser Physics.* 2005; 15 (9): 1299–1302.
19. Qui L., Zhao W., Sick T. Quantitative analysis of brain NADH in the presence of hemoglobin using microfiber spectrofluorometry: a pre-calibration approach. *Computers in Biol. Med.* 2005; 35: 583–601.
20. Reinert K.C., Dunbar R.L., Gao W. et al. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *J. Neurophysiol.* 2004; 92: 199–211.
21. Rex A., Fink F. Applications of laser-induced fluorescence spectroscopy for the determination of NADH in experimental neuroscience. *Laser Phys. Letts.* 2006; 3 (9): 452–459.
22. Steinbrink J., Liebert A., Wabnitz H. et al. Towards noninvasive molecular fluorescence imaging of the human brain. *Neurodegenerative Dis.* 2008; 5: 296–303.
23. Taga G., Asakawa K., Hirasawa K. and Konishi Y. Hemodynamic responses to visual stimulation in occipital and frontal cortex of newborn infants: A near-infrared optical topography study. *Early Human Development.* 2003; 75 (Suppl.): S203–S210.
24. Zhou L., Stanley W.C., Saidel G.M. et al. Regulation of lactate production at the onset of ischemia is independent of mitochondrial NADH/NAD<sup>+</sup>: insights from in silico studies. *J. Physiol.* 2005; 569.3: 925–937.

## Laser-induced autofluorescence for assessment of metabolism and hemodynamic characteristics of the brain

A.B. Salmina, V.V. Salmin, O.V. Frolova, D.I. Laletin, M.A. Fursov, D.P. Skomorokha, A.A. Fursov, M.A. Kondrashov, N.N. Medvedeva,  
N.A. Malinovskaya, N.S. Mantorova

*Department of Biochemistry, Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,  
Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry,*

*Department of Histology and Embryology Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky*

*Department of Photonics and Laser Technologies, IEPRE, Siberian Federal University (Krasnoyarsk)*

**Key words:** brain, autofluorescence, pyridine nucleotides

The paper contains results of the investigation of the laser-induced fluorescence detection method for the assessment of brain metabolism *in situ* through the dura mater. Models of anoxia and acute brain ischemia were used for the evaluation of reliability of the method utilizing registration of reduced tissue

pyridine nucleotides fluorescence, as well as for the assessment of the viability index, based on the conversion of oxy- and deoxyhemoglobin. Some pathobiochemical mechanisms of alterations in the pool of pyridine nucleotides in anoxia and ischemia were analyzed.

**Контактный адрес:** Салмина Алла Борисовна — докт. мед. наук, проф., зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, д. 1. Тел.: +7 (391) 228-07-69, факс: +7 (391) 220-10-71; e-mail: allasalmina@mail.ru

Салмин В.В. — канд. физ.-мат. наук, доц. кафедры фотоники и лазерных технологий Института инженерной физики и радиоэлектроники Сибирского федерального университета (Красноярск);

Фролова О.В. — науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, асс. кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Лалетин Д.И. — клинический ординатор кафедры урологии, андрологии и сексологии Института последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Фурсов М.А. — клинический ординатор кафедры анестезиологии и реаниматологии Института последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Скомороха Д.П. — студ. V курса Института инженерной физики и радиоэлектроники Сибирского федерального университета;

Фурсов А.А. — канд. мед. наук, асс. кафедры анестезиологии и реаниматологии Института последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Кондрашов М.А. — студ. V курса специальности «лечебное дело» Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Медведева Н.Н. — докт. мед. наук, проф., зав. кафедрой гистологии и эмбриологии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Малиновская Н.А. — канд. мед. наук, науч. сотр. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, доц. кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого;

Манторова Н.С. — старш. преподаватель кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск).