

УДК 681.784.8

**МЕТОД ОПТИЧЕСКОЙ ДИФфуЗИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ
ДЛЯ *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ
ОКСИГЕНАЦИИ ОПУХОЛИ**

Г.Ю. Голубятников, А.В. Масленникова, А.Г. Орлова, Т.И. Пряникова

Продемонстрированы возможности метода оптической диффузионной спектроскопии (ОДС) для неинвазивной оценки динамики нескольких параметров, характеризующих степень оксигенации экспериментальной опухоли при ее искусственной модификации. На фоне действия препарата пентоксифиллина, повышающего микроциркуляторную перфузию, с помощью данного метода выявлены изменения содержания окисленной и восстановленной форм гемоглобина, а также уровня насыщения крови кислородом. Повышение содержания оксигемоглобина, характеризующего поступление кислорода в ткани наряду со снижением содержания дезоксигемоглобина, характеризующего его потребление, наблюдаемые после введения препарата, свидетельствуют о восстановлении уровня насыщения крови кислородом в зоне экспериментальной опухоли.

Ключевые слова: степень оксигенации опухоли, оптическая диффузионная спектроскопия, неинвазивная диагностика, коррекция кислородного статуса, пентоксифиллин, лимфосаркома Плисса.

Введение

Состояние гипоксии (снижение парциального давления кислорода <10–15 мм рт. ст.) является характерной особенностью большинства солидных опухолей. К настоящему времени доказано, что гипоксия относится к ряду ключевых факторов опухолевой прогрессии и является источником резистентности к действию лучевой и химиотерапии [1]. Причиной возникновения гипоксии являются особенности микроциркуляторного русла опухоли. Оно характеризуется примитивностью и хаотичностью, в силу чего теряет способность удовлетворять потребности в кислороде быстро растущей опухолевой паренхимы [2]. Гипоксия обнаруживается в зонах, отдаленных от сосудов (150–200 мкм), или в таких зонах, где скорость потребления кислорода превышает скорость его поступления, а также вблизи сосудов с временным нарушением перфузии [3–5]. С целью преодоления проблемы резистентности опухоли к лечебному воздействию в настоящее время развивается ряд методов, направленных на улучшение уровня оксигенации опухолевой ткани. К таким агентам относятся радио- и химиомодификаторы, переносчики кислорода различной природы, электронно-акцепторные соединения, гипербарическая оксигенация, карбоген, гипертермическое воздействие [6–8]. Для оценки эффективности способов коррекции кислородного статуса опухоли необходима разработка новых подходов, позволяющих получать информацию о динамике ее оксигенации *in vivo*. Однако известные на сегодняшний день методы определения кислородного статуса [9, 10] имеют ряд ограничений в силу их инвазивности (полярография с микроэлектродами, вводимыми в

ткани), невозможности проведения повторного исследования (методы *ex vivo*), либо материальной и технической сложности (магнитно-резонансная томография и протонно-эмиссионная томография). В данной работе для оценки изменений степени оксигенации опухоли представлен метод ОДС, который основан на получении информации от многократно рассеянного света, способного проходить через ткани толщиной до нескольких сантиметров. Применение различных длин волн позволяет наблюдать тканевые составляющие, такие как окси- (HbO_2), дезоксигемоглобин (Hb), вода, липиды, используя дисперсию показателя поглощения данных соединений. Метод дает возможность определять пространственное распределение концентраций окисленной и восстановленной форм гемоглобина, и, соответственно, оценивать степень насыщения крови кислородом (StO_2) [11–13]. В качестве агента, оказывающего влияние на уровень оксигенации опухоли, был использован препарат, повышающий микроциркуляторную перфузию – пентоксифиллин.

Материалы и методы

В работе использовалась ОДС-установка, сконструированная в Институте Прикладной Физики РАН, Нижний Новгород (рис. 1) [13, 14]. В качестве источников излучения в установке используются полупроводниковые лазеры с волоконным выходом на трех длинах волн: 684 нм, соответствующей максимуму поглощения восстановленного гемоглобина; 850 нм, соответствующей максимуму поглощения оксигемоглобина; 794 нм, на которой коэффициенты поглощения окисленного и восстановленного гемоглобина совпадают. Диаметр поперечного сечения пучка лазерного излучения на объекте составляет 4 мм. В данной установке применяется высокочастотная (140 МГц) модуляция интенсивности лазерного излучения. Детектирование прошедшего через ткани излучения осуществляется с помощью фотоэлектронного умножителя.

Эксперименты проводились на белых нелинейных крысах с перевитой экспериментальной опухолью (лимфосаркома Плисса). Во время сканирования животные помещались в кювету с иммерсионной жидкостью с оптическими параметрами, близкими тканям животного. Сканирование выполнялось при синхронном пошаговом перемещении источника и детектора, расположенных с противоположных сторон исследуемого объекта с шагом 1–2 мм. Из полученных ОДС-изображений путем численной обработки проводилось восстановление двумерного распределения концентраций HbO_2 , Hb и уровня StO_2 . Для расчетов использовали табличные значения коэффициентов поглощения [15]. Уровень StO_2 рассчитывали как $[\text{HbO}_2]/([\text{Hb}] + [\text{HbO}_2])$.

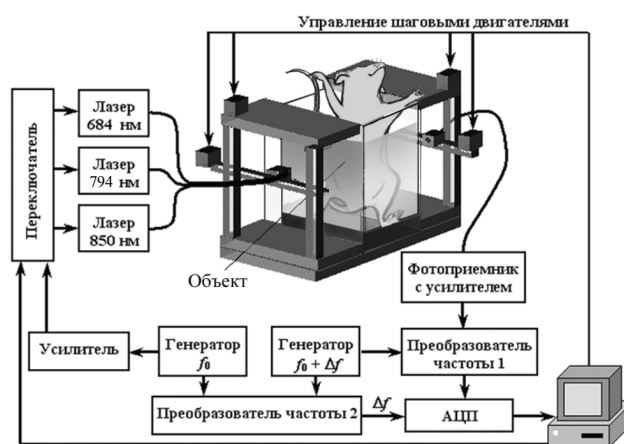


Рис. 1. Схема ОДС-установки

ОДС-исследование начинали на четвертый–шестой день после перевивки опухоли. Пентоксифиллин вводили внутривенно однократно в концентрации 50 мг/кг. Осуществляли сканирование интактной опухоли, затем проводили мониторинг через 15, 30, 60 минут и 4 часа после введения препарата.

Результаты и обсуждение

Метод ОДС позволяет наблюдать динамику уровня оксигенации опухоли на фоне применения агента, модифицирующего кислородный статус. На рис. 2 приведен пример распределения концентраций Hb, HbO_2 и уровня StO_2 в проекции опухолевого узла до и после введения пентоксифиллина. На ОДС-изображениях интактного новообразования наблюдается повышенный, по сравнению с окружающими нормальными тканями, уровень восстановленного гемоглобина и сниженный уровень окисленного гемо-

глубина, что свидетельствует о нарушении баланса между поступлением и потреблением кислорода в опухоли. Низкое содержание HbO_2 , характеризующего поступление O_2 в ткани, а также высокое содержание HHb , характеризующего его потребление, формируют сниженный уровень насыщения крови кислородом. Полученные результаты соответствуют биологическим особенностям лимфосаркомы Плисса, для которой характерен быстрый рост, высокая клеточность, высокая митотическая активность и раннее образование некрозов [16]. Исходя из морфологических и физиологических черт данной опухоли, можно предположить низкий уровень ее оксигенации и наличие обширных зон гипоксии.

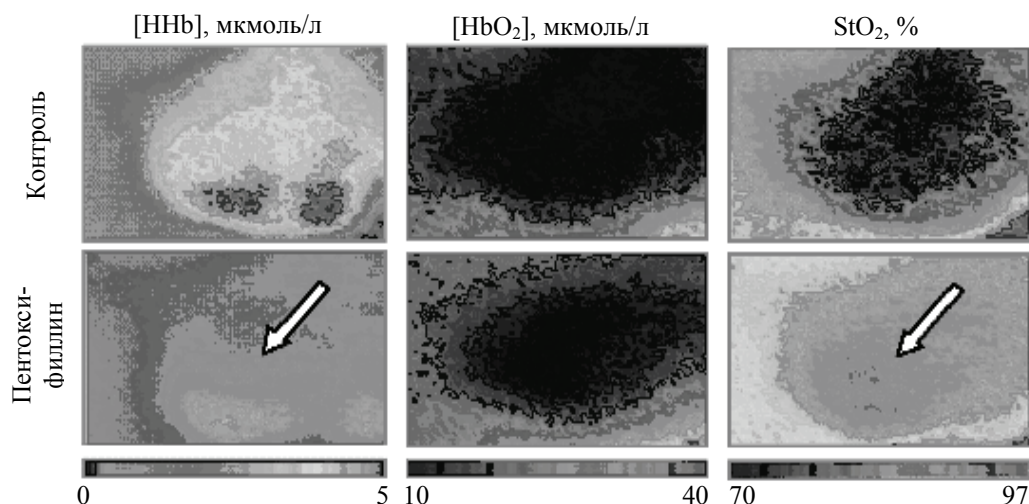


Рис. 2. Карты двумерного распределения концентраций восстановленного гемоглобина (HHb), окисленного гемоглобина (HbO_2) и уровня насыщения крови кислородом (StO_2), полученные при ОДС-исследовании зоны лимфосаркомы Плисса до (контроль) и через 4 часа после введения пентоксифиллина. Стрелками указана зона опухоли

После введения пентоксифиллина на ОДС-изображениях наблюдается снижение концентрации дезоксигемоглобина (после введения препарата концентрация HHb в зоне опухоли была практически такой же, как и в окружающих здоровых тканях) и повышение содержания окисленной формы соединения. Такие изменения приводят к существенному росту уровня насыщения крови кислородом в проекции опухолевого узла и, вероятно, кислородного статуса опухоли. В работах [3–4, 17] показано, что введение пентоксифиллина повышает перфузию тканей благодаря вазоактивному влиянию, повышению скорости кровотока, росту эластичности клеток крови. Все перечисленные механизмы лежат в основе ускорения доставки кислорода к опухолевым клеткам с током крови и, соответственно, приводят к снижению степени гипоксии и повышению уровня оксигенации ткани.

Заключение

Метод ОДС позволяет наблюдать динамику уровня оксигенации экспериментальных опухолей под воздействием препарата, повышающего микроциркуляторную перфузию тканей – пентоксифиллина. С использованием опухолевой модели лимфосаркомы Плисса показано, что данный препарат вызывает возрастание уровня насыщения крови кислородом в зоне новообразования. Указанное изменение обусловлено повышением содержания оксигемоглобина и снижением содержания дезоксигемоглобина в проекции опухолевого узла. Данный метод может быть использован для разработки и тестирования новых агентов, оказывающих влияние на кислородный статус тканей.

Литература

1. Eriksen J.E., Horsman M.R. Tumor hypoxia – a characteristic feature with a complex molecular background // *Radiotherapy and Oncology*. – 2006. – V. 81. – № 2. – P. 119–121.
2. Brown J.M., Giaccia A.J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy // *Cancer Research*. – 1998. – V. 58. – P. 1408–1416.
3. Bennewith K.L., Durand R.E. Drug-induced alterations in tumour perfusion yield increases in tumour cell radiosensitivity // *British Journal of Cancer*. – 2001. – V. 85. – № 10. – P. 1577–1584.

4. Zywiets F., Bohm L., Sagowski C., Kehrl W. Pentoxifylline Enhances Tumor Oxygenation and Radiosensitivity in Rat Rhabdomyosarcomas during Continuous Hyperfractionated Irradiation // *Strahlenther Onkol.* – 2004. – V. 180. – P. 306–314.
5. Collingridge D.R. and S. Rockwell. Pentoxifylline improves the oxygenation and radiation response of BA1112 rat rhabdomyosarcomas and EMT6 mouse mammary carcinomas // *Int. J. Cancer (Radiat. Oncol. Invest).* – 2000. – V. 90. – P. 256–264.
6. Horsman M.R. Nicotinamide and other benzamide analogs as agents for overcoming hypoxic cell radiation resistance in tumours // *Acta Oncol.* – 1995. – V. 34. – № 5. – P. 571–587.
7. Song C.W., Park H., Griffin R.J. Improvement of Tumor Oxygenation by Mild Hyperthermia // *Radiation research.* – 2001. – V. 155. – P. 515–528.
8. Teicher B.A., Schwartz G.N., Alvarez Sotomayor E., Robinson M.F., Dupuis N.P., Menon K. Oxygenation of tumors by a hemoglobin solution // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* – 1993. – V. 120. – P. 85–90.
9. Serganova I., Humm J., Ling C., Blasberg R. Tumor Hypoxia Imaging // *Clinical Cancer Research.* – 2006. – V. 12. – № 18. – P. 5260–5264.
10. Davda S., Bezabeh T. Advances in methods for assessing tumor hypoxia in vivo: implications for treatment planning // *Cancer and Metastasis Reviews.* – 2006. – V. 25. – № 3. – P. 469–480.
11. Cerussi A., Hsiang D., Shah N., Mehta R., Durkin A., Butler J. and B.J. Tromberg. Predicting response to breast cancer neoadjuvant chemotherapy using diffuse optical spectroscopy // *PNAS.* – 2007. – V. 104. – № 10. – P. 4014–4019.
12. Brown J.Q., Wilke L.G., Geradts J., Kennedy S.A., Palmer G.M. and N. Ramanujam. Quantitative Optical Spectroscopy: A Robust Tool for Direct Measurement of Breast Cancer Vascular Oxygenation and Total Hemoglobin Content In vivo // *Cancer Research.* – 2009. – V. 69. – № 7. – P. 2919–2926.
13. Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I., Shakhova N.M., Fiks I.I., Kleshnin M.I., Konuchenko N.Yu., Kamensky V.A. Frequency-domain diffuse optical tomography with single source-detector pair for breast cancer detection // *Laser Physics Letters.* – 2008. – V. 5. – № 4. – P. 321–327.
14. Масленникова А.В., Голубятников Г.Ю., Орлова А.Г., Плеханов В.И., Артифексова А.А., Шахова Н.М., Каменский В.А., Турчин И.В. Неинвазивный оптический метод оценки кислородного статуса новообразований молочной железы // *Опухоли женской репродуктивной системы.* – 2010. – Т. 1. – С. 5–10.
15. Optical Absorption of Hemoglobin [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/>, своб.
16. Плисс Б.Б. Онкологическая характеристика нового штамма ЛФС крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1961. – Т. 2. – С. 95–99.
17. Honess D.J., Andrews M.S., Ward R., Bleehe N.M. Nicotinamide and pentoxifylline increase human leucocyte filterability: a possible mechanism for reduction of acute hypoxia // *Acta Oncol.* – 1995. – V. 34. – P. 385–389.

Голубятников Герман Юрьевич

– Институт прикладной физики РАН, кандидат физ.-мат. наук, glb@ufp.appl.sci-nnov.ru

Масленникова Анна Владимировна

– Нижегородская государственная медицинская академия Росздрава, Институт прикладной физики РАН, доктор медицинских наук, профессор, maslennikova.anna@gmail.com

Орлова Анна Геннадьевна

– Институт прикладной физики РАН, кандидат биологических наук, orlova@ufp.appl.sci-nnov.ru

Пряникова Татьяна Игоревна

– Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, студентка, tatka-echo@mail.ru