

УДК 535.37

Аппаратура и методы диагностики опухолей *in vivo* по диффузному рассеянию и флуоресценции в ближнем ИК диапазоне

Е. С. ВОРОПАЙ, М. П. САМЦОВ, В. Н. ЧАЛОВ, Ж. ДИДЕЛОН, Ф. ГИЙМЯ

Успех лечения онкологических заболеваний невозможен без своевременной и качественной диагностики. На сегодняшний день наряду с совершенствованием традиционных диагностических методов: рентгенодиагностика, радионуклидная, УЗИ, ЯМР, иммуногенетическая диагностика интенсивно развиваются направления, связанные с регистрацией и анализом излучения оптического диапазона: поглощение, флуоресценции, комбинационное рассеяние, диффузное рассеяние, т.е. методы «оптической биопсии». Перечисленные методы оптической биопсии обладают несомненными преимуществами перед наиболее широко используемым в клинике традиционным методом биопсии, поскольку ему присуща инвазивность и необходим достаточно большой промежуток времени до получения результата анализа. Одним из альтернативных методов неинвазивной диагностики, основанным на анализе взаимодействия света с биологическими тканями, является спектроскопия диффузного рассеяния. В настоящем сообщении приведены результаты исследований спектров диффузного рассеяния перевивных опухолей крыс: саркома 45, фибросаркома М-1, карцинома РС-1 и карциносаркома печени W-256 при различном расстоянии между световодами облучения и регистрации (0,53 и 1,74 мм). В видимом спектральном диапазоне 400-700 нм различий в спектрах диффузного рассеяния для опухолевых и нормальных тканей, в качестве которых использованы здоровые ткани симметричного участка тела животного, выявлено не было. В ближнем инфракрасном диапазоне для диагностики опухолей проведен анализ различия интенсивности спектров диффузного рассеяния на длинах волн 830 и 940 нм. (рис.1).

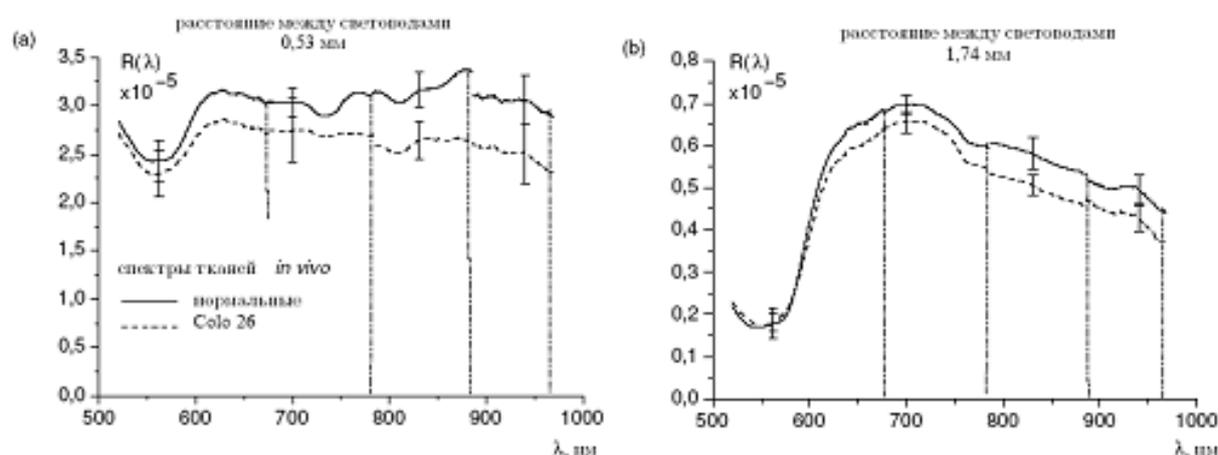


Рисунок 1 – Спектры диффузного рассеяния тканей здоровой мышцы и опухоли Colo 26 для 3-х мышей, зарегистрированные на расстоянии 0,53 и 1,74 мм между облучающими и регистрирующим световодами.

Для саркомы М-1, по сравнению с нормальными тканями, интенсивности в спектрах были достоверно ниже на обеих длинах волн и для обоих расстояний между световодами; для S-45 различия наблюдались на обеих длинах волн только при расстоянии 0,5 мм; для РС-1 интенсивности спектров различались только на длине волны 940 нм при расстоянии 1,74 мм. У опухоли W-256 различий в спектрах по сравнению с нормальными тканями выявлено не было. Полученные результаты демонстрируют возможность регистрации различий *in vivo*

между нормальными и некоторыми видами опухолевых тканей с помощью спектроскопии диффузного рассеяния, которая можно рассматривать перспективным методом неинвазивной диагностики в онкологии.

Флуоресцирующие вещества, способные накапливаться в злокачественных новообразованиях, можно использовать в качестве диагностических средств онкологических заболеваний. Перспективными в этом плане представляются индотрикарбоцианиновые красители, имеющие полосы поглощения и флуоресценции в ближнем ИК диапазоне (область прозрачности биологических тканей). Для проведения такого рода диагностики требуется соответствующее спектральное оборудование. В связи с этим в НИИ ПФП им. А. Н. Севченко был разработан спектрометрический комплекс, позволяющий проводить оперативный флуоресцентный анализ содержания красителей в тканях живых организмов [1]. С помощью разработанного оборудования была изучена фармакокинетика симметричного индотрикарбоцианинового красителя ТИКС, который перспективен как для диагностики, так и для фототерапии опухолей [2,3].

В качестве фотосенсибилизатора использован индотрикарбоцианиновый краситель с 4-хлорзамещенной гептаметиновой цепью сопряжения и привитой по азоту глюкозой (ТИКС), который разработан и синтезирован в лаборатории спектроскопии НИИ ПФП им. А.Н. Севченко.

Эксперименты *in vivo* проводились на беспородных белых крысах с перевитыми в области бедра опухолями следующих штаммов: саркома 45 (S-45), саркома М1 (SM-1), карциносаркома Уокера (W-256). Препарат вводили животным внутривенно (группы из 6÷8 животных) в количестве 1÷2 миллиграмма на килограмм массы тела. Для экспериментов *in vitro* культуру клеток HeLa (плоскоклеточный рак шейки матки человека) рассеивали в стеклянные флаконы диаметром 2 см, по 100 тыс. клеток на 2 мл питательной среды 199 с 10 % сыворотки крови телят и 100 мг/мл канамицина и инкубировали в течение 3-х суток при температуре 37 °С.

Спектры поглощения регистрировались с помощью спектрофотометра PV 1251А, спектры флуоресценции - с помощью спектрофлуориметра Fluorolog фирмы Spex.

Концентрация красителя в крови и образцах тканей животных определялась путем их экстракции 2% раствором тритона X-100 и последующей регистрации флуоресценции с помощью спектрофлуориметра Fluorolog. При этом непременно контролировалась оптическая плотность образцов экстрактов, при необходимости разбавлением образцов обеспечивалась линейное соответствие сигнала флуоресценции и концентрации красителей.

Регистрация флуоресценции красителя *in vivo* проводились с помощью спектрометра LESA-6 (Москва) и нового комплекса аппаратуры разработанного в НИИ ПФП им. А.Н. Севченко. В качестве источника возбуждающего излучения в LESA-6 использован *He-Ne* лазер с длиной волны 632.8 нм (мощность на выходе из световода 15 мВт). Подвод возбуждающего излучения к исследуемому объекту и регистрация флуоресценции осуществлялись с помощью оптического волокна. В новом комплексе аппаратуры в качестве источника света использован полупроводниковый лазер с длиной волны излучения 683 нм. Поскольку биологические ткани обладают неравномерностью оптических свойств, связанной, в первую очередь с наличием кровеносной системы, для обеспечения усреднения регистрируемого сигнала по объему исследуемого образца и устранения влияния неоднородности ткани на результаты измерений диаметр светового пучка в месте регистрации составлял 8 мм. В обеих экспериментальных установках регистрация флуоресценции осуществлялась непосредственно через кожу, для учета уровня рассеянного света и собственной флуоресценции биологических тканей проводились контрольные измерения для интактных крыс до начала введения препарата животным. Важным параметром прибора является линейность его фотометрической шкалы, которая проверялась по наличию пропорциональности сигнала флуоресценции мощности возбуждающего и соответственно регистрируемого излучения.

Форма спектра флуоресценции красителя ТИКС *in vivo*, при возбуждении на $\lambda = 632,8$ нм, оказывается в значительной степени искажена люминесценцией биотканей по сравнению со спектром при возбуждении на $\lambda = 683$ нм (см. рис.2). На высокочастотном краю спектра

при более коротковолновом возбуждении присутствует плечо в области 705 нм. Увеличение длины волны возбуждения примерно на 50 нм приводит практически к полному исчезновению свечения опухоли интактной крысы. При этом спектр флуоресценции красителя *in vivo* приобретает характерный для ПК вид, положение максимума и форма которого совпадает со спектром красителя в раковых клетках HeLa. Поскольку спектральные характеристики ПК сильно зависят от полярности среды [3], полученный результат позволяет заключить, что молекулы красителя в ткани и в модельной среде раковых клеток имеет практически одинаковое окружение.

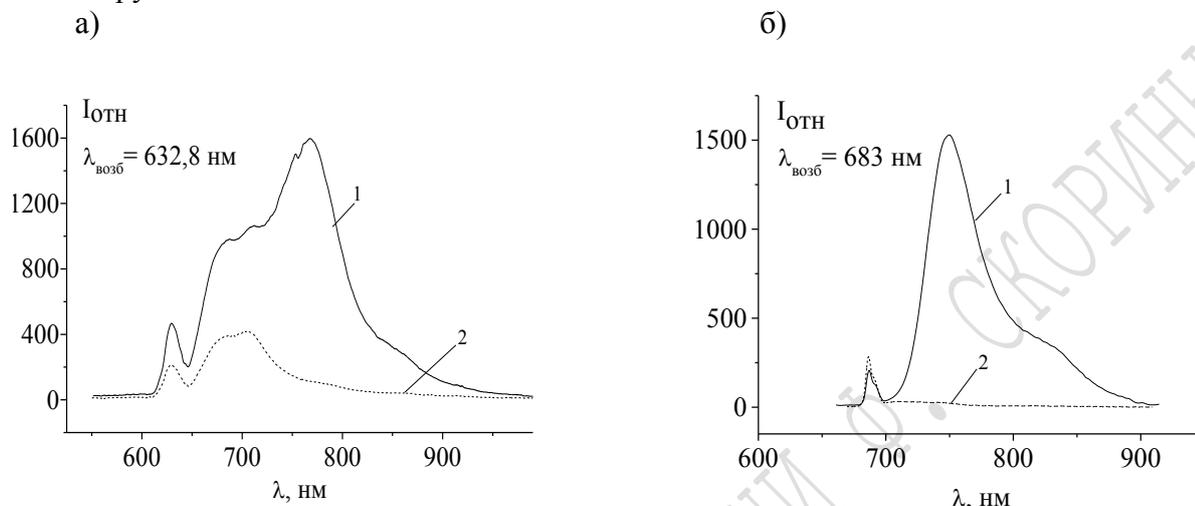


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции красителя ТИКС *in vivo* (1) и спектры испускания опухолевой ткани интактной крысы (2) при возбуждении излучением а) - $\lambda=632,8$ нм и б) - $\lambda=683$ нм.

Путем регистрации интенсивности флуоресценции *in vivo* была исследована фармакокинетика красителя. На рисунке 3 видно, что в течении первых 1,5 часов сигнал растет и в опухолевых, и в здоровых тканях. В дальнейшем по мере распределения сенсibilизатора по тканям сигнал падает (следующие 1,5 часа). После этого наблюдается повышение избирательности накопления красителя в опухолевых тканях – до 2 часов. Полученные данные позволяют определять оптимальное время накопления красителя в опухоли, сравнивать концентрацию красителя для разных животных и учитывать эти обстоятельства для повышения эффективности последующего сеанса фототерапии.

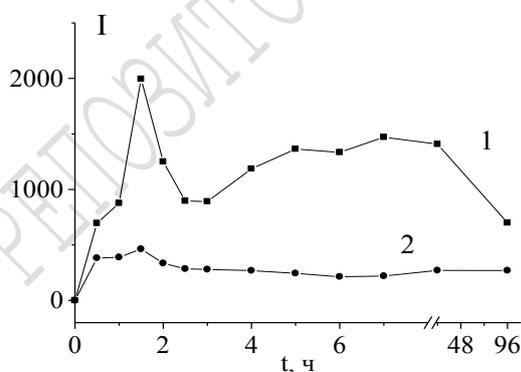


Рисунок 3 – Интенсивность люминесценции красителя ТИКС в здоровой ткани (2) и в опухоли саркома 45 (1) от времени.

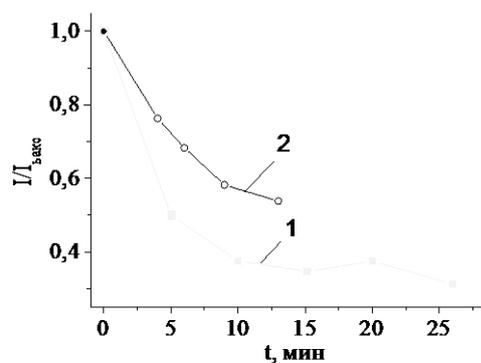


Рисунок 4 – Относительная интенсивность люминесценции красителя в опухоли от времени фотовоздействия при дозе света 240 Дж/см², при плотности мощности 150 (1) и 300 мВт/см² (2).

На рисунке 4 представлены зависимости интенсивности флуоресценции красителя в здоровой ткани и в опухоли в зависимости от времени фотовоздействия на опухолевый узел излучением с длиной волны 740 нм при плотности мощности 150 и 300 мВт/см². Из рисунка видно, что в процессе фотооблучения падает интенсивность флуоресценции, которая в данном случае, пропорциональна концентрации красителя. Уменьшение концентрации красителя связано с его фотодеструкцией под действием лазерного излучения. Поэтому время фотовоздействия (в случае 150 мВт/см²) целесообразно ограничить пятнадцатью минутами, когда концентрация красителя достаточно высокая. Таким образом, можно для различных значений плотности мощности, определять наиболее оптимальную экспозиционную дозу светового воздействия.

Не менее важным, наряду со световой дозой, параметром, определяющим эффективность фототерапии, является плотность мощности фотооблучения. Облучение светом с плотностью мощности 150 мВт/см² при прочих равных условиях, приводит к более значительному некрозу, по сравнению с 300 мВт/см². При этом относительная интенсивность флуоресценции красителя для 150 мВт/см² претерпевает большие изменения со временем (см. рис.4). Таким образом, оперативный контроль за флуоресценцией красителя можно использовать для оптимизации параметров фотовоздействия непосредственно в ходе сеанса фототерапии.

Работа выполнена при поддержке INTAS (проект 03-50-5765) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Ф06МС-037 и Ф06-185).

Abstract. It has been found that the revealed spectral differences in the tissues under study are due mainly to their different scattering properties. An optimum time of the cyanine dye accumulation in tumors has been determined, contents of the dye in different organs have been compared, the processes of the dye photodestruction have been studied in vivo, and optimum conditions for photochemotherapeutic procedures have been established.

Литература

1. Е.С. Воропай, М.П. Самцов, А.Е. Радько, К.Н. Каплевский, К.А. Шевченко, Лазерная диагностика онкологических заболеваний на основе анализа флуоресценции полиметинового красителя, Лазерные материалы, системы и технологии нового поколения: физические основы создания и применения. Мат. Республиканской межвузовской научной конференции. Минск, 4 декабря 2003 г. / Под. ред. доктора физ.-мат. наук Н.В. Кулешова — Мн.: УП «Техгопринт» (2004) 36—46.
2. Y. P. Istomin, E. N. Alexandrova, E. A. Zhavrid, E. S. Voropay, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevsky, A. P. Lugovsky, A. A. Lugovsky, The effect of hypoxia on photocytotoxicity of TICS tricarbocyanine dye in vitro, *Experimental oncology*, **28**, N 1, (2006), 80-82.
3. Е.С. Воропай, М.П. Самцов, В.Н. Чалов, Э.А. Жаврид, Флуоресценция полиметинового красителя ТИКС и диагностика рака, *Журн. прикл. спектр.*, **68**, № 3. (2001), 359—362.
4. Е.С. Воропай, М.П. Самцов, К.Н. Каплевский, А.А. Луговский, Спектрально-люминесцентные свойства катионных индотрикарбоцианиновых красителей в раковых клетках и растворах, *Журн. прикл. спектроскопи*, **71**, №2, (2004), 168—172.