

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИПОКСИИ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ

© 2015 г. Е. Н. Петрицкая, канд. биол. наук; Д. А. Куликов, канд. мед. наук;  
Д. А. Рогаткин, доктор техн. наук; И. А. Гусева; П. А. Куликова

Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского,  
Москва

E-mail: medphys@monikiweb.ru

Лазерная флуоресцентная спектроскопия (ЛФС) *in vivo* в медицине используется, в основном, в онкологии для диагностики злокачественных опухолей. В статье описываются и описываются эксперименты, в ходе которых моделировались состояния местной гипоксии и воспаления, не являющиеся злокачественными. Методами ЛФС оценивалась динамика вынужденной флуоресценции эндогенных порфиринов в первом случае и экзогенного фотосенсибилизатора “Фотосенс” во втором случае. Обнаружено повышение интенсивности флуоресценции в области патологии в обоих случаях по сравнению с интактной областью. Это заставляет по-новому взглянуть на результаты ЛФС в онкологии и дает основания предполагать, что она может являться перспективным методом диагностики *in vivo* ишемической гипоксии и воспалительных процессов и в других разделах медицины, помимо онкологии.

**Ключевые слова:** лазер, флуоресценция, спектроскопия, биоткань, окклюзия, ишемия, гипоксия, воспаление.

Коды OCIS: 170.6280, 170.2655, 170.6510.

Поступила в редакцию 09.02.2015.

### Введение

В настоящее время одним из перспективных методов неинвазивной (*in vivo*) диагностики состояния мягких биологических тканей является лазерная флуоресцентная спектроскопия (ЛФС) [1]. Давно известно, что в процессе нормальной жизнедеятельности вследствие разных физиологических реакций, а также при нарушении нормального метаболизма, особенно при развитии патологических процессов, в клетках меняется относительное содержание ряда природных (эндогенных) флуорофоров. В биологии и медицине это служит предметом исследований методами ЛФС [2]. Одним из таких важных природных флуорофоров в тканях является порфирин [3]. Около 100 лет назад было замечено, что развитие злокачественных новообразований сопровождается повышенным накоплением порфиринов в тканях опухоли [4, 5]. В конце XX века это привело к созданию методов фотодинамической терапии (ФДТ) и флуоресцентной диагностики опухолей, включая методы флуоресцентной интраоперационной

навигации, основанные на способности клеток опухоли накапливать в повышенных концентрациях эндогенные порфирины и их производные, а также другие экзогенные (введенные извне, например внутривенно) фотоактивные вещества – фотосенсибилизаторы [6, 7].

Однако до сих пор причины повышенного накопления порфирина и других фотосенсибилизаторов в опухолях полностью не выяснены [3, 8, 9]. Базовой гипотезой является аккумуляция порфирина активно пролиферирующими раковыми клетками с низким рН из тока крови [3, 7, 9]. Но есть основания полагать, что накопление порфирина осуществляется любыми клетками, не только раковыми, в состоянии хронической гипоксии [9, 10]. Возможным объяснением повышенного накопления порфиринов в клетках при гипоксии является не только снижение рН, но прямое увеличение субстрата для синтеза порфирина – сукцинила СоА, который является продуктом катаболизма белков, жиров и углеводов [11]. Он образуется при окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и затем гидролизуется

с сопряженным переносом тиоэфирной связи на гуанозиндифосфате (ГДФ) с образованием гуанозинтрифосфата (ГТФ). Возможно, именно эти процессы активизируются при гипоксии и увеличивают выработку сукцинила-СоА.

Как известно, гипоксия клеток злокачественных новообразований сопровождается рост опухолей в большинстве случаев [9]. Это заставляет по-новому взглянуть на возможности и эффективность ФДТ и ЛФС в онкологии. Локализации пула раковых, активно делящихся клеток, и пула гипоксических клеток опухоли могут не совпадать друг с другом. В этом случае неминуемы ошибки ЛФС и снижение эффективности ФДТ. Более того, рост опухоли, особенно на III–IV стадиях, часто сопровождается также ишемией и воспалением, но надежных экспериментальных данных по динамике флуоресценции порфиринов и других фотосенсибилизаторов в условиях этих доброкачественных процессов мы не обнаружили, хотя теоретически возможность их повышенного накопления в таких условиях существует. Воспаление, например, является типичным процессом, который развивается при любом повреждении тканей и проявляется нарушением кровообращения, изменением состава крови и соединительной ткани в виде альтерации, экссудации и пролиферации [12]. По данным литературы, в тканях очага воспаления тормозятся процессы дыхания и синтеза аденозинтрифосфорной кислоты, меняется окислительно-восстановительный статус клеток и концентрации флуоресцирующих форм таких эндогенных флуорофоров, как NAD(P)H, флавопротеинов, коллагенов и др. [3]. Поэтому можно предположить, что воспаление и ишемия также могут быть причиной повышенного накопления порфирина и других фотосенсибилизаторов в тканях.

Целью нашего исследования стало изучение динамики вынужденной флуоресценции *in vivo* в тканях эндогенных и экзогенных флуорофоров в условиях ишемии и воспаления. В отличие от работы [10], где рассматривались случаи хронической гипоксии, в данном исследовании было рассмотрено накопление эндогенных порфиринов при острой ишемической гипоксии, смоделированной путем механической окклюзии сосудов. Также экспериментально изучалось накопление экзогенного фотосенсибилизатора “Фотосенс” на основе фталоцианина алюминия в условиях моделируемого воспаления.

## Материалы и методы

Регистрация флуоресценции осуществлялась во всех экспериментах с помощью лазерной диагностической системы “ЛАКК-М” [13] (рис. 1). Доставка возбуждающего лазерного излучения к исследуемым тканям и излучения флуоресценции обратно в диагностическую систему осуществлялась при помощи оптического волоконного жгута, входящего в состав системы “ЛАКК-М”. Длины волн возбуждения флуоресценции – 532 нм (твердотельный лазер) в экспериментах с ишемией и 635 нм (полупроводниковый лазер) в экспериментах с воспалением. Диапазон длин волн регистрации флуоресценции порфирина и фталоцианина алюминия – 640–800 нм. Типовые спектры флуоресценции тканей для длин волн возбуждения 532 и 635 нм при повышенном накоплении порфирина представлены на рис. 2а, 2б. Пики на длинах волн 640 нм и 710 нм соответствуют пикам флуоресценции порфирина.

Для сопоставимого соотнесения полученных спектральных данных по флуоресценции в разных условиях они были математически преобразованы в индексы тканевого содержания флуорофора  $\eta(\lambda_f)_{\lambda_e}$  (см. работу [1]), где

$$\eta(\lambda_f)_{\lambda_e} = I_f(\lambda_f) / (I_f(\lambda_f) + I_{\text{laser}}(\lambda_e)) = 1 / (1 + I_{\text{laser}}(\lambda_e) / I_f(\lambda_f)). \quad (1)$$

Здесь  $I_f(\lambda_f)$  – интенсивность сигнала флуоресценции на длине волны флуоресценции  $\lambda_f$ ,  $I_{\text{laser}}(\lambda_e)$  – регистрируемый и уменьшенный светофильтром в  $\beta$  раз ( $\beta \approx 10^3$  [13]) максимум интенсивности обратного рассеянного тканью лазерного излучения на длине волны возбуждения флу-

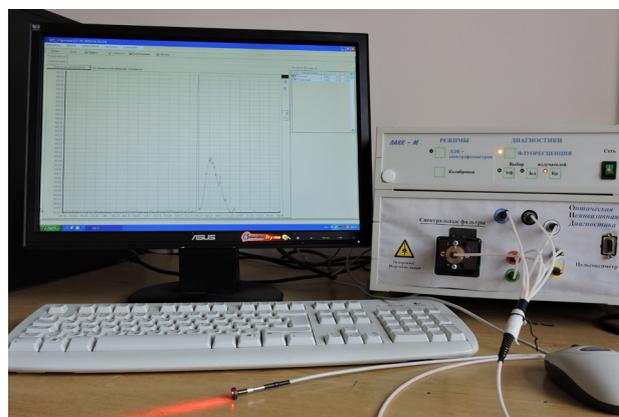


Рис. 1. Диагностическая система “ЛАКК-М” и процедура измерения.

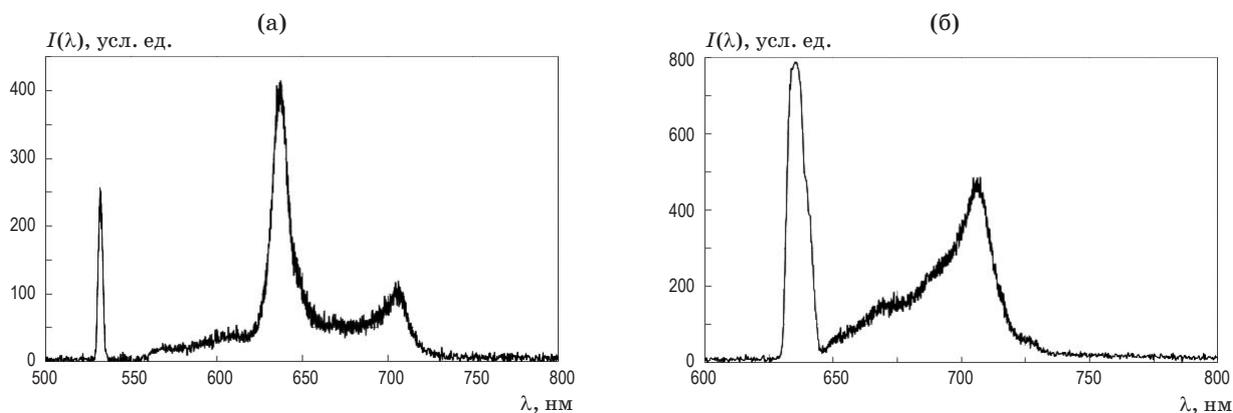


Рис. 2. Типовые спектры флуоресценции биоткани на – длине волны возбуждения 532 (а) и 635 нм (б).

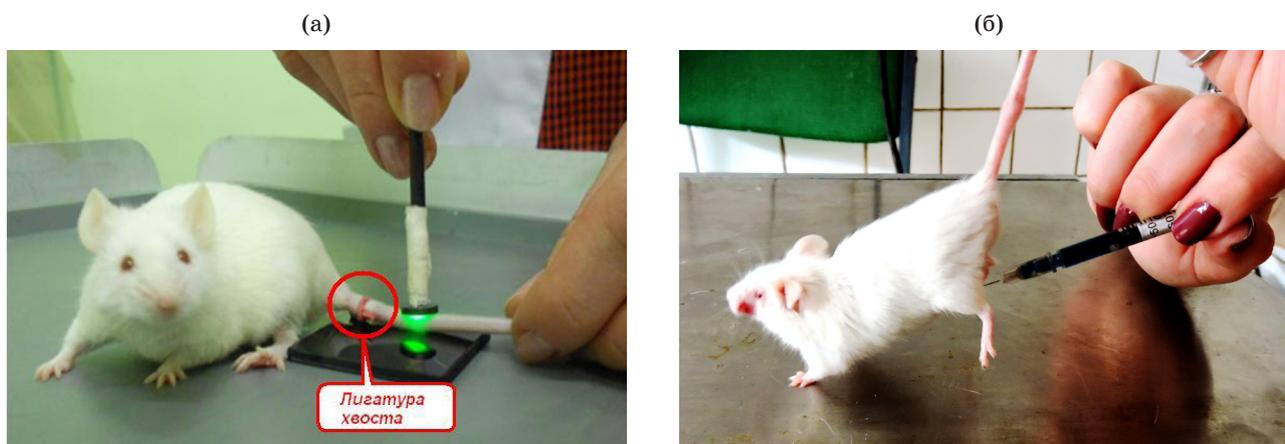


Рис. 3. Процедуры введения фотосенсибилизатора “Фотосенс” (а) и снятия спектров флуоресценции (б).

оресценции  $\lambda_c$ . Такое представление результатов позволяет свести спектральные данные в компактный диапазон значений от 0 до 1 и качественно учесть разную оптическую плотность тканей с помощью нормировки на обратно рассеянный сигнал источника [1].

В первой серии экспериментов моделировалась ишемическая гипоксия тканей путем наложения лигатуры (жгута, затрудняющего кровоток) на хвост экспериментальным крысам Wistar ( $N = 3$ ) на срок до 48 часов. В процессе развития в тканях хвоста ишемии и некроза определялось изменение сигнала флуоресценции эндогенных порфиринов с поверхности кожи хвоста животного по длине хвоста (рис. 3а).

Во второй серии экспериментов на двух группах нелинейных белых мышей ( $N = 12$ ) инициировалось воспаление в мышцах бедра путем внутримышечной инъекции 0,25 мл суспензии микрокапсул с ядром  $\text{CaCO}_3$  в биорезорбируемой полиэлектролитной оболочке.

Всем мышам внутрибрюшинно вводился фотосенсибилизатор “Фотосенс” из расчета 0,5 мг/кг (рис. 3б). В первой группе мышей оценивалась динамика флуоресценции фотосенсибилизатора “Фотосенс” в пораженном бедре в сравнении с интактным здоровым бедром. Второй группе экспериментальных животных проводили ампутацию исследуемой конечности для проведения визуального контроля места поражения на 1, 3, 11, 25-е сутки после введения микрокапсул. Эти животные предварительно подвергались эвтаназии путем введения летальной дозы анестетика “Уретан” – 200 мг/кг массы тела.

Все экспериментальные исследования были выполнены<sup>1</sup> с соблюдением принципов Хельсинской Декларации о гуманном отношении к животным, а также принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообще-

<sup>1</sup> Экспериментальная работа с животными осуществлялась биофизиком Смирновой О. Д.

ства (86/609/ЕС) и в Приказе Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г. “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”.

## Результаты и обсуждение

В случае моделирования ишемической гипоксии наблюдалось постепенное увеличение флуоресценции эндогенных порфиринов с поверхности хвоста животного в диапазоне длин волн 640–710 нм по мере развития ишемии. Значение индекса тканевого содержания порфирина в коже хвоста крысы для  $\lambda_f = 640$  нм увеличивалось при удалении дистально по хвосту от места окклюзии, коррелируя со степенью поражения тканей от ишемии (рис. 4). Действительно, теоретически с удаленностью от точки окклюзии кислород и глюкоза за счет диффузии поступают в клетки в меньших концентрациях, и метаболиты клеточной жизнедеятельности выводятся с меньшей скоростью. Таким образом, по мере удаления от точки окклюзии вниз по хвосту степень ишемической гипоксии должна увеличиваться. Полученные данные ЛФС показывают, что степень повреждения тканей для порфиринов при острой ишемической гипоксии хорошо объективизируется методом с помощью индекса  $\eta(640)_{532}$ . Порфирины накапливаются в условиях окклюзионной ишемии в коже в повышенных концентрациях по сравнению с условиями нормального кровообращения.

В сериях экспериментов, посвященных изучению флуоресценции экзогенного фотосенси-

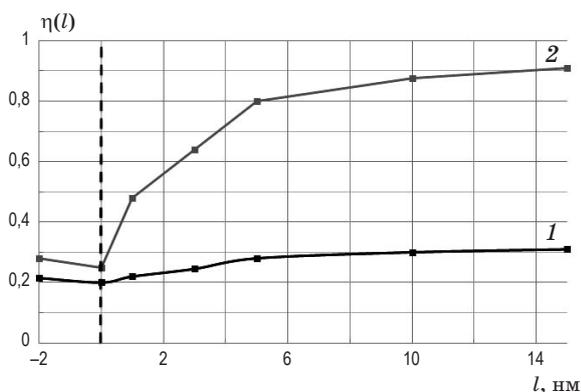


Рис. 4. Интенсивность сигнала флуоресценции с кожи хвоста до окклюзии (1), спустя 24 часа после окклюзии (2).  $\eta_f(l)$  – индекс тканевого содержания флуорофора,  $l$  – расстояние от лигатуры вдоль хвоста, вертикальная пунктирная линия – точка наложения лигатуры.

билизатора “Фотосенс” в условиях моделирования воспаления путем внутримышечного введения мышам микрокапсулированного карбоната кальция, на пике развития процесса интенсивность сигнала флуоресценции с поверхности бедра непосредственно над местом воспаления в 3–4 раза превосходила этот показатель для интактного бедра (рис. 5). В данном эксперименте наблюдались следующие характерные изменения интенсивности сигнала флуоресценции: через 1 час после введения фотосенсибилизатора сигнал флуоресценции увеличивался, спустя 2–3 суток наблюдалось его угасание, а затем – возрастание (рис. 6). Данное поведение предположительно может соответствовать типичным стадиям развития воспаления [12, 14]. Так, понижение сигнала флуоресценции на вторые–третьи сутки может соответствовать развитию отека (экссудации) первой фазы воспаления, а возрастание сигнала на 6–7 сутки – окончанию

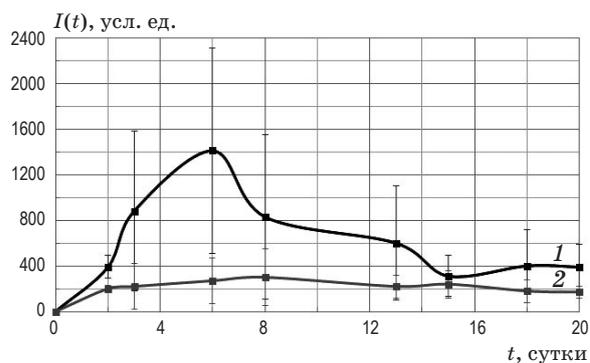


Рис. 5. Динамика интенсивности сигнала флуоресценции в случае введения некапсулированных ядер  $\text{CaCO}_3$  (1 – в интактном бедре, 2 – в месте инъекции).  $I(\lambda)$  – интенсивность флуоресценции,  $t$  – время после введения.

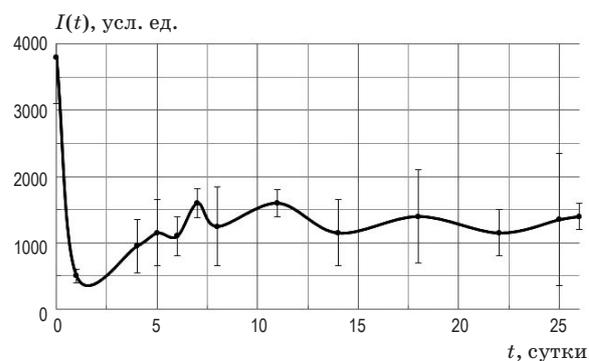


Рис. 6. Динамика интенсивности сигнала флуоресценции в случае воспаления.  $I(t)$  – интенсивность флуоресценции,  $t$  – время после введения.

второй, пролиферативной фазы. В целом, во всех случаях в месте инъекции микрокапсул интенсивность сигнала флуоресценции оказалась выше, чем в интактном бедре, что наблюдалось на протяжении трех недель.

Это может быть вызвано гипоксическим состоянием ткани и воспалительной реакцией на повреждение при механическом введении в них препарата, что было продемонстрировано на второй экспериментальной группе мышей. Эвтаназия экспериментальных животных второй группы и вскрытие области введения препарата в мышце показали наличие объемного нерезорбируемого кальцината в месте инъекции, сохраняющегося там на протяжении 5 недель и более (рис. 7). Следует особо отметить, что количество вводимого препарата микрокапсул (0,25 мл) было достаточно велико для объема тканей бедра обычной мыши. Масса отложений, в основном солей кальция, в мышце составляла до 25 мг. Вокруг отложений такого размера и состава неизбежно развитие реактивного воспаления. Отложение такого количества солей кальция должно приводить к изменению анатомической структуры и повреждению сосудистого и лимфатического микроциркуляторного русла мышцы бедра (что и было обнаружено при вскрытии), которые провоцируют гипоксию тканей. То есть воспаление в данном случае сопровождается гипоксией.

Таким образом, экспериментально выявлено, что повреждение тканей при ишемии и воспалении характеризуется повышенной вынужденной флуоресценцией и повышенным накоплением как эндогенных, так и экзогенных флуорофоров локально в области воспаления и ишемии, что подтверждает наше предположение, высказанное во введении к данной статье. Более того, степень повреждения тканей при ишемии и воспалении, как показывают полученные данные, хорошо коррелирует с индексом тканевого содержания флуорофора  $\eta(\lambda_f)_{\lambda_e}$ , т.е. вероятно, возможна оценка и стадий развития этих процессов в тканях по уровням  $\eta(\lambda_f)_{\lambda_e}$ . С одной стороны, это заставляет по-новому взглянуть на трактовку результатов ЛФС в онкологии. Хорошо оксигенированные раковые клетки могут оказаться невидны методами ЛФС *in vivo* и в реальном времени на фоне сильно флуоресцирующих областей гипоксии и воспаления в опухоли. С другой стороны, факт повышенного накопления флуорофоров, подтвержденный в данной работе,



Рис. 7. Кальциевый и кальций-полимерный сгусток (комоч) в месте инъекции.

открывает возможность создания методов неинвазивной экспресс-диагностики местных воспалительных процессов, ишемии и гипоксии при помощи ЛФС в других областях медицины.

### Заключение

В данной работе экспериментально продемонстрирован феномен повышенной флуоресценции эндогенных и экзогенных флуорофоров в тканях *in vivo* на примере эндогенного порфирина и фталоцианина алюминия соответственно в случае окклюзионной ишемии и модельного воспаления. Для регистрации флуоресценции использовались методика, технология и аппаратура, часто применяемые в онкологии при проведении процедур ФДТ, флуоресцентной интраоперационной навигации при хирургическом удалении опухолей мозга и т.п. Однако в данном исследовании отсутствовали какие-либо злокачественные новообразования в тканях экспериментальных животных. Все исследуемые процессы являлись доброкачественными. Полученный результат означает, что состояния ишемии, гипоксии и воспаления должны учитываться при интерпретации результатов ЛФС в онкологии. С другой стороны, выявленный факт повышенного накопления флуорофоров при ишемии и воспалении открывает возможности разработки методик неинвазивной экспресс-диагностики местных воспалительных процессов, ишемии и гипоксии, а также методов оценки при помощи ЛФС эффективности терапии этих состояний в клиниках самого разного профиля.

\* \* \* \* \*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rogatkin D., Shumskiy V., Tereshenko S., Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical application // *Photonics & Laser in Medicine*. 2013. V. 2. № 3. P. 225–240.
2. Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine. N.Y.: Academic Press, 1962. 517 p.
3. Mycek M.-A., Pogue B.W. Handbook of biomedical fluorescence. N.Y.: Marcel Dekker Inc., 2003. 665 p.
4. Tappeiner H., Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen // *Muench Med. Wochenschr.* 1903. V. 50. P. 2041–2051.
5. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood // *Compte Rendus. Soc. Biol. (Paris)*. 1924. V. 91. P. 1423–1424.
6. Berns M.W., Wile A.G. Hematoporphyrin phototherapy of cancer // *Radiotherapy and Oncology*. 1986. V. 7. № 3. P. 233–240.
7. Harris D.M., Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors // *Lasers Surg. Med.* 1987. V. 7. № 4. P. 467–472.
8. Rogatkin D.A., Bychenkov O.A., Lapaeva L.G. The accuracy, reliability and interpretation of the results of *in vivo* laser fluorescence diagnosis in the spectral range of the fluorescence of endogenous porphyrins // *J. Opt. Tech.* 2009. V. 76(11). P. 708–713.
9. El-Sharabasy M.M.H., El-Wassel A.M., Hafez M.M., Salim S.A. Porphyrin metabolism in some malignant diseases // *Br. J. Cancer*. 1992. V. 65. P. 409–412.
10. Litvinova K.S., Rogatkin D.A., Bychenkov O.A., Shumskiy V.I. Chronic hypoxia as a factor of enhanced autofluorescence of endogenous porphyrins in soft biological tissues // *Proc. SPIE*. 2010. V. 7547. P. 7547-0D. 6 p.
11. Зайко Н.Н., Быць Ю.В. Патологическая физиология. Учебник. М.: Медпресс-Информ, 2008. 640 с.
12. Серов В.В., Пауков В.С. Воспаление. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1995. 639 с.
13. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petrinskaya E.N., Sidorov V.V., Shumskiy V.I. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and metrological provisions for that // *Proc. SPIE*. 2009. V. 7368. P. 73681Y. 7 p.
14. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. Учебник. М.: Медицина, 1995. 688 с.