



## НЕИНВАЗИВНЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ КИСЛОРОДНОГО СТАТУСА НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.В. Масленникова<sup>1,2</sup>, Г.Ю. Голубятников<sup>2</sup>, А.Г. Орлова<sup>2</sup>, В.И. Плеханов<sup>2</sup>,  
А.А. Артифексова<sup>1,2</sup>, Н.М. Шахова<sup>2,1</sup>, В.А. Каменский<sup>2</sup>, И.В. Турчин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Нижегородская государственная медицинская академия;

<sup>2</sup>Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

### NON-INVASIVE OPTICAL METHOD FOR EVALUATING THE OXYGEN STATUS IN BREAST NEOPLASMS

A.V. Maslennikova<sup>1,2</sup>, G.Yu. Golubyatnikov<sup>2</sup>, A.G. Orlova<sup>2</sup>, V.I. Plekhanov<sup>2</sup>,

A.A. Artifeksova<sup>1,2</sup>, N.M. Shakhova<sup>2,1</sup>, V.A. Kamensky<sup>2</sup>, I.V. Turchin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nizhni Novgorod State Medical Academy; <sup>2</sup>Institute of Applied Physics,  
Russian Academy of Sciences, Nizhni Novgorod

*The paper presents the results from a study of the breast oxygen status by diffuse optical tomography (DOT). Detection of breast tissue at wavelengths of 684, 794, and 850 nm could provide information on the distribution of basic tissue chromophores: oxygenized and deoxygenized hemoglobin. Normal breast tissue was characterized by the even distribution of these compounds and stabilization of their level. In breast cancer, the distribution of oxy- and deoxyhemoglobin was noted for uneven distribution and blood oxygen saturation was lower in the projection of a tumor nodule. The blood oxygen saturation data obtained by DOT demonstrate physiological differences between normal and tumor tissues in different tumor areas.*

**Key words:** breast cancer, tumor oxygenation, diffuse optical tomography, non-invasive diagnosis

Рак молочной железы (РМЖ) — одна из наиболее актуальных проблем современной онкологии, представляет собой морфологически и патогенетически полиморфное заболевание, характеризующееся спектром конкретных биологических особенностей [1, 2]. В течение последних 10—15 лет были выявлены ключевые механизмы его развития и прогрессирования, а также обнаружены молекулярные маркеры, наличие или отсутствие которых позволяет строить прогноз заболевания и определять индивидуальную тактику лечения [2]. Большие успехи были достигнуты в разработке методов ранней диагностики и скрининга РМЖ. Тем не менее до настоящего времени остаются нерешенными многие вопросы, связанные с диагностикой, мониторингом лечения и определением биологических особенностей опухоли, влияющих на прогноз заболевания.

Кислородный статус злокачественных новообразований (ЗН) рассматривается в настоящее время как один из ключевых факторов, определяющих прогноз заболевания и эффективность лечебных воздействий [3]. Состояние хронической гипоксии, которое является характерной физиологической особенностью солидных опухолей, возникает в результате несовершенного по сравнению с нормальными тканями неоангиогенеза [4]. При наличии в ЗН обширных зон со сниженным парциальным давлением кислорода эффективность лучевой и химиоте-

рапии существенно снижается [5, 6]. Кроме того, гипоксия опосредованно воздействует на пути сигнальной трансдукции и регуляцию транскрипции ряда генов и белков, являясь, таким образом, независимым источником опухолевой прогрессии [7, 8]. Прогностическое значение сниженной оксигенации новообразования было продемонстрировано в клинике для плоскоклеточного рака полости рта и рака шейки матки [9, 10].

Известные на сегодняшний день способы определения степени оксигенации тканей имеют существенные ограничения. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование позволяет получить точную картину распределения оксигенированных и гипоксических зон, но может быть осуществлено только *ex vivo* и не подходит для динамического наблюдения [11]. Полярграфическое измерение рО<sub>2</sub>, которое является «золотым стандартом» определения кислородного статуса тканей [12], возможно только в случае поверхностных опухолей; кроме того, из-за инвазивности метода его применение в клинике крайне ограничено. Магнитно-резонансная, позитронно-эмиссионная и компьютерная томография эмиссией одиночных фотонов с контрастирующими агентами малодоступны для широкого применения в силу высокой стоимости. Таким образом, на сегодняшний день не существует доступного и неинвазивного метода, позволяющего до начала лечения получить информацию

о кислородном статусе опухоли, а в последующем проводить динамические исследования его изменений.

Метод оптической диффузионной томографии (ОДТ) основан на различиях в оптических свойствах (показатели поглощения и рассеяния) здоровых и патологических участков тканей [13–17]. ОДТ имеет широкий ряд приложений, связанных с необходимостью проводить исследования структур и процессов, протекающих глубоко под поверхностью (до 8 см). Применение различных длин волн позволяет наблюдать тканевые составляющие, имеющие различный оптический контраст. Определение состава тканей основано на различной зависимости коэффициента поглощения ее компонентов от длины волны. Основными хромофорами в красном и инфракрасном диапазоне длин волн являются оксигенированный — окисленный (Hb) и деоксигенированный — восстановленный (O<sub>2</sub>Hb) гемоглобин, вода и липиды, которые значительно отличаются друг от друга по спектрам поглощения [18]. Это позволяет проводить исследование кровенаполнения, общего содержания гемоглобина, степени оксигенации крови, содержания воды и концентрации липидного компонента. Перечисленные свойства существенно отличаются в нормальных и опухолевых тканях [15].

**Цель исследования** — изучение возможностей ОДТ в определении кислородного статуса опухолей молочной железы.

#### Материалы и методы

Обследование методом ОДТ было проведено у 5 добровольцев в возрасте от 22 до 59 лет без клинически определяемой патологии молочной железы и у 8 пациенток Нижегородского областного онкологического диспансера в возрасте от 30 до 77 лет, которым был поставлен диагноз РМЖ I–IIb стадии.

Наличие ЗН во всех случаях было подтверждено цитологически. Процедура ОДТ осуществлялась накануне оперативного вмешательства, после которого выполнялись гистологическое и ИГХ-исследования удаленной опухоли. Работа проводилась на основании разрешения этического комитета Нижегородской государственной медицинской академии. Все пациентки подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

ОДТ выполняли на установке (рис. 1), разработанной в Институте прикладной физики РАН (Нижний Новгород) [17]. Сканирование осуществлялось на 3 длинах волн: 684 нм, соответствующей максимуму поглощения восстановленного гемоглобина, 850 нм, соответствующей максимуму поглощения оксигемоглобина, и 794 нм, на которой коэффициенты поглощения окисленного и восстановленного гемоглобина совпадают. Данные о поглощении на всех 3 длинах волн необходимы при расчете компонентного состава тканей. Прошедшее сквозь ткани молочной железы диффузно рассеянное излучение от лазерных источников детектировалось с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Сканирование выполнялось при синхронном пошаговом перемещении источника и детектора, расположенных в сагиттальной оси с противоположных сторон исследуемого объекта. Максимальный возможный размер области сканирования составил 15×15 см<sup>2</sup>. В каждой позиции источник—детектор производилось считывание данных от всех 3 источников. Общее время сканирования составляло от 10 до 30 мин в зависимости от размера молочной железы.

В ходе сканирования молочная железа располагалась между 2 стеклянными пластинами, препятствующими ее контакту с излучателем и фотоприемником, и слегка сдавливалась с це-

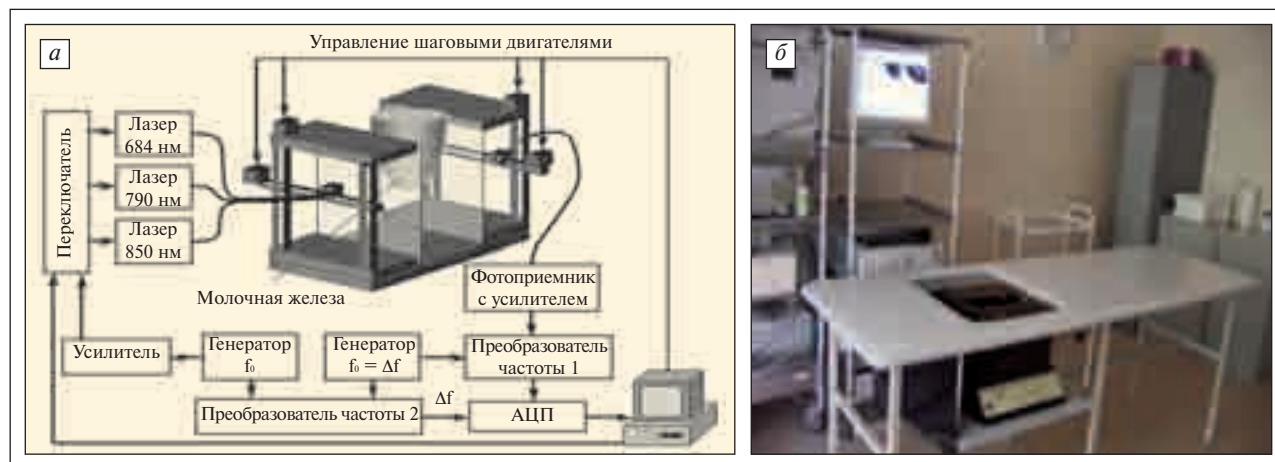


Рис. 1. Схема (а) и внешний вид (б) ОДТ-установки

лю выравнивания толщины органа в области сканирования. Расстояние между пластинами фиксировалось. В качестве метода сравнения использовали ультразвуковое исследование (УЗИ), которое проводилось на аппарате ALOKA SSD 3500 непосредственно перед процедурой ОДТ.

Первым этапом исследования было получение ОДТ-изображений непосредственно в процессе сканирования. На них отображалась амплитуда прошедшего через исследуемую ткань излучения для 3 длин волн. Локальное изменение соответствующих показателей свидетельствовало о наличии оптической неоднородности в исследуемой зоне.

На втором этапе путем численной обработки полученных изображений воссоздавали картину распределения коэффициентов поглощения и рассеяния на 3 длинах волн.

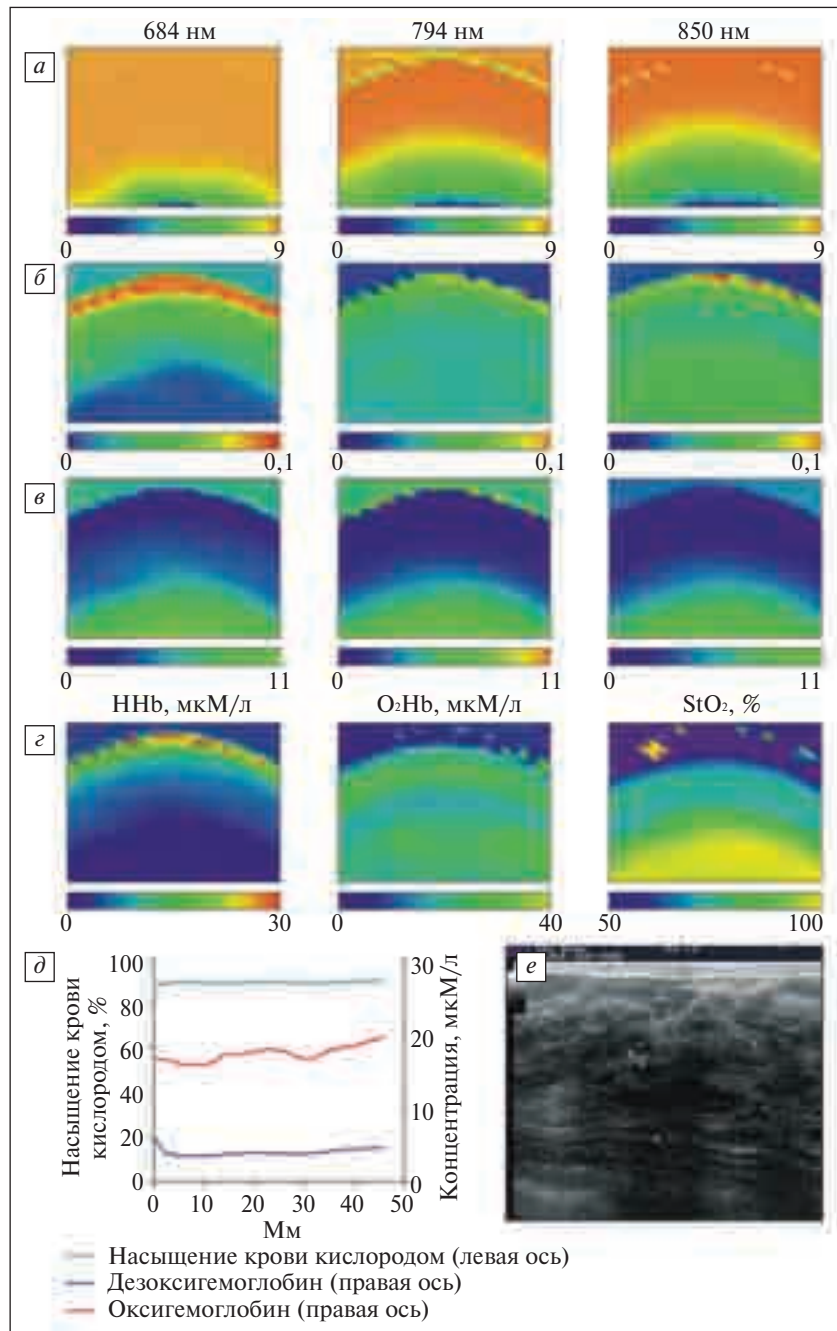
Конечным этапом было восстановление двумерного распределения концентраций окисленного и восстановленного гемоглобина и уровня сатурации крови ( $StO_2$ ). Уровень насыщения крови кислородом определяли как  $StO_2 = [O_2Hb] / [Hb + O_2Hb] \times 100\%$  [17].

**Результаты**

Проведенное пилотное исследование продемонстрировало, что максимальная возможная глубина детектирования составляет 80 мм. ОДТ-изображения молочной железы в норме характеризовались однородностью и отсутствием каких-либо включений (рис. 2). Амплитуда сигнала, так же как коэффициенты поглощения и рассеяния, не изменялась на всей области сканирования (см. рис. 2а, б, в). В ткани молочной железы отмечали равномерное распределение и наличие стабильных концентраций оксигенированного и восстановленного гемоглобина, а также равномерное насыщение крови кислородом (см. рис. 2г). Уровень сатурации крови в норме составлял от 80 до 90%, при этом

с возрастом наблюдалась тенденция к его снижению.

В отличие от нормы, на ОДТ-изображениях молочной железы при наличии злокачественного новообразования визуализировались оптические неоднородности, при этом зона опухоли четко выделялась на фоне окружающих тканей. Непосредственно в процессе исследования в области новообразования на всех длинах волн фиксировалось снижение амплитуды сигнала (рис. 3а).



**Рис. 2.** Результаты ОДТ-исследования молочной железы в норме. Амплитуда сигнала, усл. ед. (а); распределение коэффициентов поглощения (б) и рассеяния (в), см<sup>-1</sup>; двумерное (г) и одномерное (д) распределение окси- (O<sub>2</sub>Hb) и дезокси- (Hb) гемоглобина, уровня насыщения крови кислородом (StO<sub>2</sub>); е — УЗИ. Размер ОДТ-изображения 50×50 мм



Проекция расположения опухоли на ОДТ-изображении отличалась от нормальной ткани повышенным поглощением на всех длинах волн, что может объясняться присутствием в этой области более высоких концентраций хромофоров (рис. 3б). На картах, характеризующих двумерное распределение коэффициента рассеяния в проекции новообразования, выделялись участки с повышенным содержанием рассеивающих включений (рис. 3в), что может быть связано с увеличением количества органелл и содержания стромальных компонентов в опухолевой ткани [19].

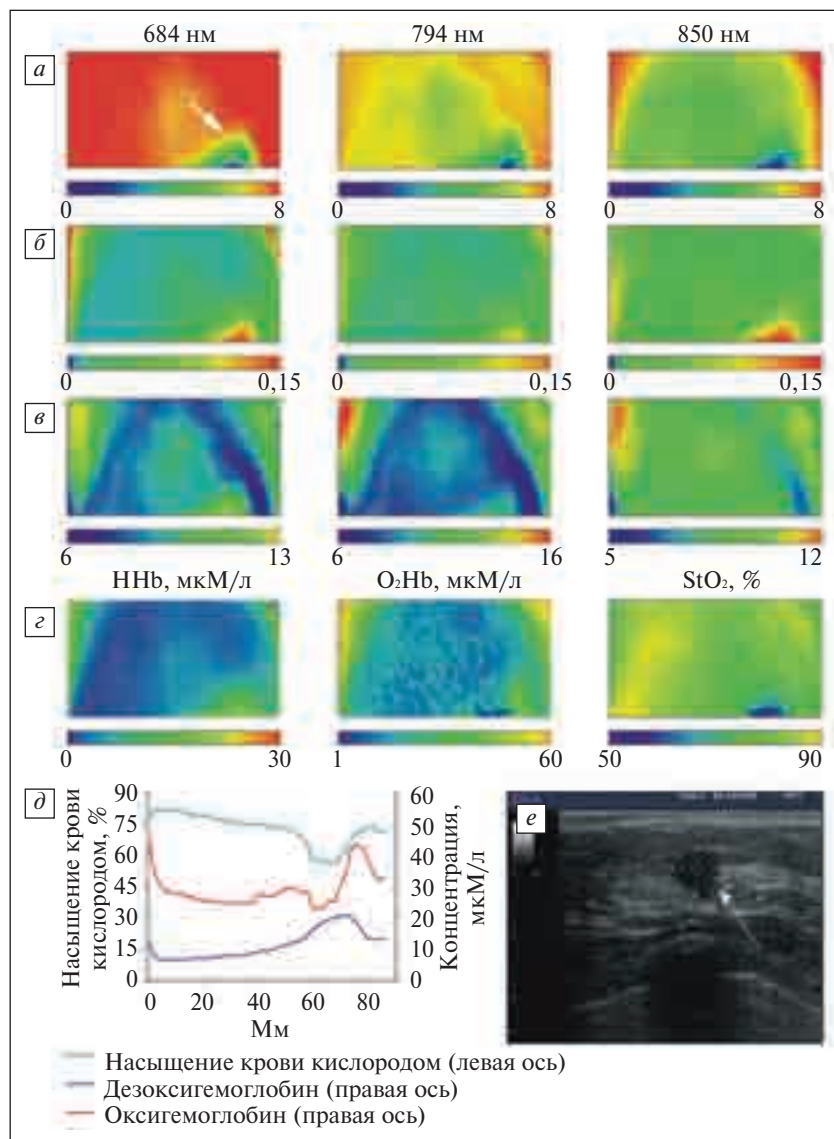
Полученные данные были использованы для восстановления распределения concentra-

ций оксигенированного и деоксигенированного гемоглобина для ткани молочной железы в зоне опухоли. Как показали результаты обработки ОДТ-данных, ткани опухоли отличаются от окружающих нормальных тканей по уровню насыщения крови кислородом, а также по содержанию окси- и дезоксигемоглобина. В зоне опухоли концентрация окисленного и восстановленного гемоглобина оказалась выше, чем в окружающих здоровых тканях, а уровень насыщения кислородом по сравнению с ними был снижен (рис. 3г).

Еще одной особенностью, отличающей новообразование от неизменной ткани молочной железы, являлась неравномерность рас-

пределения концентраций исследуемых хромофоров внутри опухоли. На рис. 3д продемонстрировано одномерное распределение содержания окисленной и восстановленной форм гемоглобина, а также уровня насыщения крови кислородом в зоне опухоли. По нашим данным, центральная зона новообразования характеризовалась повышенным содержанием восстановленной формы гемоглобина, тогда как в периферической части преобладала окисленная форма. Уровень насыщения крови кислородом снижался от периферии к центральной части опухоли (см. рис. 3г, д).

Наконец, ОДТ-изображения опухолей молочной железы отличала уникальность картины распределения соединений, косвенно отражающих кислородный статус опухолевой ткани. У всех пациенток опухоли молочной железы соответствовали критериям T1 и T2, т.е. их размеры не превышали 5 см; при УЗИ отличия сонограмм были крайне незначительными; гистологическое строение опухоли соответствовало инвазивной карциноме средней и низкой степени дифференцировки. Тем не менее распределение концентраций изученных соединений существенно отличалось в каждом клиническом случае. Важно отметить, что даже в случае на-



**Рис. 3.** Результаты ОДТ-исследования молочной железы пациентки Н. Диагноз: рак правой молочной железы T1N0M0, I стадия. Амплитуда сигнала, усл. ед. (а), распределение коэффициентов поглощения (б) и рассеяния (в), см<sup>-1</sup>; двумерное (г) и одномерное (д) распределение окси- (O<sub>2</sub>Hb) и дезокси- (HHb) гемоглобина, уровня насыщения крови кислородом (StO<sub>2</sub>); е — УЗИ. Размер ОДТ-изображения 90×50 мм. Стрелкой указана зона опухоли

личия новообразований, размеры которых не превышали 1 см, удавалось обнаружить зоны, в которых сатурация кислорода была существенно снижена (рис. 3, 4).

На рис. 3г представлена картина распределения концентраций окси- и дезоксигемоглобина в опухоли молочной железы у пациентки Н., 48 лет. Опухоль, по данным УЗИ, имела размеры 10×7×9 мм, т.е. соответствовала критериям T1. На протяжении 15 мм, в зоне, соответствующей проекции опухоли на ОДТ-изображении, отмечалось постепенное, от периферии к центру, повышение содержания дезоксигемоглобина по сравнению с окружающими тканями. Максимум концентрации данного соединения составил 20 мкМоль/л при его уровне в нормальной ткани молочной железы, не превышающем 10 мкМоль/л. В той же зоне в проекции центра опухоли наблюдалось снижение концентрации окисленного гемоглобина, а по ее периферии — возрастание уровня данного соединения.

На рис. 4 продемонстрировано распределение исследованных хромофоров у пациентки К., 28 лет. Опухоль молочной железы, по данным УЗИ, состояла из 2 не сливающихся между собой узлов размерами 13×16×17 и 16×15×15 мм. На ОДТ-изображениях в проекции опухоли наблюдались 2 очага со сниженным содержанием как окси-, так и дезоксигемоглобина. В то же время уменьшение сатурации крови было отмечено только в одном из них.

### Обсуждение

Помимо традиционных критериев (распространенность и локализация опухолевого процесса, степень дифференцировки опухоли, наличие и степень регионарного поражения), в настоящее время в клинике активно используются биологически значимые показатели, которые играют важную роль при определении прогноза заболевания и выборе тактики лечения РМЖ [1]. Кислородный статус новообразования, один из наиболее важных в этом отношении факто-

ров, до настоящего времени мог быть определен только путем прямого полярографического измерения парциального давления кислорода в нормальной и опухолевой ткани. Проведенные измерения продемонстрировали существенное снижение  $pO_2$  в ЗН молочной железы, которое коррелировало со снижением уровня гемоглобина [20]. Данный инвазивный метод, однако, имеет ограничения в клинической практике и является неприемлемым для динамического наблюдения.

Наше пилотное исследование позволило выявить возможности ОДТ в изучении закономерностей, характеризующих распределение оксигенированного и восстановленного гемоглобина и насыщение кислородом нормальной и опухолевой ткани молочной железы. Обнаруженная в ЗН неравномерность распределения основных хромофоров может косвенным образом характеризовать такой важный для прогноза заболевания параметр, как наличие и уровень гипоксии опухоли. Проведение ОДТ до начала лечения позволило дополнить информацию, полученную при использовании стандартных методов визуализации (УЗИ и маммография). В случае подтверждения полученных результатов с применением прямых методов определения гипоксии, таких как ИГХ-исследование, с помощью предложенного метода ОДТ станет возможным неинвазивное и доступное получение важной дополнительной информации о биологических особенностях новообразований молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08-02-01042), Федерального агентства по науке и инновациям (проекты №02.522.11.2002, 02.512.11.2244) и Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине». Авторы выражают благодарность администрации и персоналу Нижегородского областного онкологического диспансера за помощь в проведении клинических исследований.

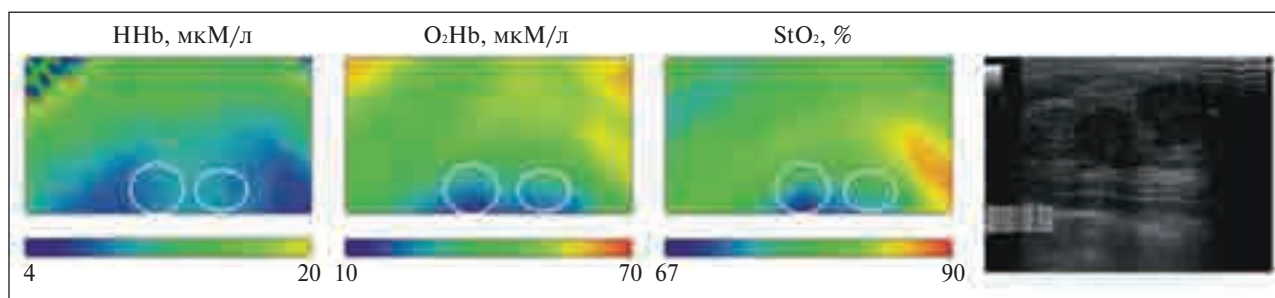


Рис. 4. Результаты ОДТ-исследования молочной железы пациентки К. Диагноз: рак правой молочной железы T1(2)N1M0, IIb стадия. Распределение окси- ( $O_2Hb$ ) и дезокси- ( $Hb$ ) гемоглобина, уровня насыщения крови кислородом ( $StO_2$ ). Размер ОДТ-изображения 60×30 мм. Белыми линиями обозначены проекции опухолевых узлов

ЛИТЕРАТУРА

1. Явишева Т.М., Щербаков С.Д., Савлучинская Л.А. Особенности работы морфофункциональных зон в нормальном эпителии, фиброаденоме и раке молочной железы. Докл Акад Наук 2005;404(1):125—8.
2. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Современные возможности молекулярно-биохимических методов оценки биологического «поведения» рака молочной железы. Вестн РАМН 2001;9:65—70.
3. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: Implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 2008;13(Suppl 3):21—6.
4. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989;49:6449—65.
5. Horsman M.R., Overgaard J. The oxygen effect and tumor microenvironment. In: *Basic clinical radiobiology*. G.G. Steel, ed. London: Arnold, 2002. p. 58—168.
6. Horsman M.R., Overgaard J. Preclinical studies on how to deal with patients intolerance to nicotine and carbon. *Radiother Oncol* 2004;70:301—9.
7. Koritzinsky M., Seigneuric R., Magagnin M.G. et al. The hypoxic proteome is influenced by gene-specific changes in mRNA translation. *Radiother Oncol* 2005;76:177—86.
8. Sorensen B.S., Hao J., Overgaard J. et al. Influence of oxygen concentration and pH on expression of hypoxia induced genes. *Radiother Oncol* 2005;76:187—93.
9. Nordmark M., Bentzen S.M., Rudat V. et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 2005;77:18—24.
10. Höckel M., Schlenger K., Aral B. et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509—15.
11. Yaromina A., Zips D., Thames H.D. et al. Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: The need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol* 2006;81(2):122—9.
12. Kelleher D.K., Thews O., Vaupel P. Hypoxyradiotherapy — lack of experimental evidence for preferential radio-protective effect on normal versus tumor tissue as shown by direct oxygenation measurements in experimental sarcomas. *Radiother Oncol* 1997;45:191—7.
13. Sergeev A.M., Dolin L.S., Reitze D.H. Review on optical tomography of biotissues. *Optical tomography of biotissues past, present, and future*. *Opt Photon News* 2001;July:328—53.
14. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1998.
15. McBride T.O., Pogue B.W., Poplack S. et al. Multispectral near-infrared tomography: a case study in compensating for water and lipid content in hemoglobin imaging of the breast. *J Biomed Opt* 2002;7(1):72—9.
16. Jiang H., Xu Y., Ifitimia N. et al. Three dimensional optical tomographic imaging of breast in a human subject. *IEEE Trans Med Imag* 2001;20:1334—40.
17. Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I. et al. Frequency-domain diffuse optical tomography with single source-detector pair for breast cancer detection. *Laser Phys Lett* 2008;5(4):321—7.
18. Torricelli A., Spinelli L., Pifferi A., et al. Use of a nonlinear perturbation approach for in vivo breast lesion characterization by multiwavelength time-resolved optical mammography. *Opt Express* 2003;11(8):853—67.
19. Thomsen S., Tatman D. Physiological and pathological factors of human breast disease that can influence optical diagnosis. *Ann NY Acad Sci* 1998;838:171—93.
20. Vaupel P., Mayer A., Briest S. et al. Oxygenation gain factor: a novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers. *Cancer Res* 2003;63:7634—7.

Диагностика опухолей молочной железы

## ОСОБЕННОСТИ КАРЦИНОМАТОЗНЫХ ПЛЕВРИТОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ)

**О.Г. Григорук<sup>1</sup>, Л.М. Базулина<sup>2</sup>, Л.Н. Добровольская<sup>2</sup>,  
Т.А. Максименко<sup>1</sup>, М.Н. Чечулин<sup>2</sup>, А.Ф. Лазарев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Алтайский филиал ГУ РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН;  
<sup>2</sup>ГУЗ Алтайский краевой онкологический диспансер, Барнаул

### PECULIARITIES OF CARCINOMATOUS PLEURISIES IN BREAST CANCER (CYTOLOGICAL DIAGNOSTIC METHOD)

*O.G. Grigoruk<sup>1</sup>, L.M. Bazulina<sup>2</sup>, L.N. Dobrovolskaya<sup>2</sup>, T.A. Maksimenko<sup>1</sup>, M.N. Chechulin<sup>2</sup>, A.F. Lazarev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Altai Branch, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences; <sup>2</sup>Altai Territorial Cancer Dispensary, Barnaul

*The specific features of carcinomatous pleurisy were studied in 119 patients with breast cancer (BC). The most characteristic properties of the structure of cells and the composition of pleural fluid were noted in infiltrating ductal and lobular BC. A differential diagnosis was made between mesothelioma (17%) and ovarian cancer (25%); it was difficult to perform it in lobular cancer.*

**Key words:** breast cancer, carcinomatous pleurisy, cytological diagnosis