

Перспективы мультимодальной визуализации биологических тканей с использованием флуоресцентного имиджинга

Д.К.Тучина, И.Г.Меерович, О.А.Синдеева, В.В.Жердева, Н.И.Казачкина, И.Д.Соловьев, А.П.Савицкий, А.А.Богданов м.л., В.В.Тучин

*Исследуются эффекты оптического просветления кожи лабораторных животных *ex vivo* и *in vivo* с помощью низкомолекулярных парамагнитных магнитно-резонансных контрастных агентов, используемых в магнитно-резонансной томографии (МРТ), и рентгеноконтрастного агента, используемого в компьютерной томографии (КТ), для повышения глубины зондирования и контраста изображения в методах флуоресцентной лазерной визуализации и оптической когерентной томографии (ОКТ). По спектрам коллимированного пропускания определены коэффициенты диффузии широко используемых в медицине МРТ-агентов Gadovist®, Magnevist® и Dotarem®, а также КТ-агента Visipaque® в коже мыши *ex vivo*. Применение МРТ-агентов Gadovist® и Magnevist® привело к наиболее существенному оптическому просветлению (оптическому пропусканию) кожи, что позволило достичь: 1) почти 19-кратного увеличения пропускания на длинах волн 540 нм и 7–8-кратного – в ближней ИК области 750–900 нм; 2) заметного улучшения изображений архитектуры кожи, полученных с помощью ОКТ; 3) 5-кратного увеличения отношения интенсивности флуоресценции к фону при использовании TagRFP-красного флуоресцентного маркерного белка, экспрессируемого в опухоли, после нанесения на кожу животных *in vivo* в течение 15 мин. Полученные результаты важны для мультимодальной визуализации опухолей, а именно, при комбинации лазерных флуоресцентных и ОКТ-методов с МРТ и КТ, поскольку исследуемые контрастные агенты способны одновременно повышать контраст нескольких методов визуализации.*

Ключевые слова: оптическая томография, ОКТ, МРТ, КТ, оптическое просветление, контрастные МРТ- и КТ-агенты, кожа лабораторных животных, *in vivo*, *ex vivo*.

1. Введение

При исследовании трехмерной структуры патологий биологических тканей и органов обычно используется рентгеновская компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) или оптическая томография. В основе последней лежат различные лазерные методы, такие как методы диффузного отражения, флуо-

ресцентной визуализации, фотоакустической и оптической когерентной томографии (ОКТ), которые позволяют получать информацию о структуре и функциях тканей и органов [1–4]. Использование мультимодальной биомедицинской визуализации часто является ключом к пониманию физиологических процессов, а также инструментом мониторинга прогрессирования заболевания и оптимизации лечения. Можно предположить, что мультимодальные концепции, сочетающие сильные стороны различных технологий визуализации [1, 2], могут помочь при получении высококачественной реконструкции оптических изображений. Современные методы томографической клинической визуализации, такие как КТ и МРТ, постоянно модернизируются для использования новых и все более эффективных контрастных агентов [5]. В целом, методы медицинской оптической визуализации обеспечивают высокое пространственное разрешение, быстродействие и специфический молекулярный контраст [2–4]. Однако, как правило, они имеют ограниченные глубины зондирования и поле зрения.

Оптическая визуализация тканей и органов значительно усложняется из-за сильного рассеяния света [3, 4]. Недавние достижения по уменьшению влияния рассеяния зондирующего и детектируемого лазерных пучков на получение высококонтрастных оптических изображений связаны с разработкой и применением новой методологии иммерсионного оптического просветления (ОП) тканей [3, 4, 6–32]. ОП основано на временном и обратимом выравнивании различий между показателями преломления твердых компонентов ткани и межтканевой жидкости для уменьшения структурной неоднородности и, соответственно, сильного светорассеяния, путем использо-

Д.К.Тучина. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

И.Г.Меерович, В.В.Жердева, Н.И.Казачкина, И.Д.Соловьев, А.П.Савицкий. Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

О.А.Синдеева. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83

А.А.Богданов м.л. Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2; University of Massachusetts Medical School, 55 N Lake Ave, Worcester, MA 01655, United States

В.В.Тучин. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; e-mail: tuchinvv@mail.ru

вания иммерсионных растворов – оптических просветляющих агентов (ОПА).

Для исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* были успешно применены различные биосовместимые агенты – по отдельности или в сочетании с традиционными химическими или физическими усилителями, обычно используемыми для доставки лекарств через биологические мембраны, особенно через склеру глаза, твердую мозговую оболочку и кожу [6–10, 14, 17, 23, 27, 29, 30]. В последнее время был разработан ряд более сложных ОПА для нанесения на фиксированные ткани с предварительной флуоресцентной маркировкой [11–16]. Эти многокомпонентные агенты включают в себя 3DISCO, uDISCO, FDISCO, SeeDB, ScaleS, Clear T2, PACT, FASTClear и CUBIC [11–16, 18–22, 24–28, 31, 32]. Все они успешно используются для трехмерной визуализации различных органов, включая мозг, а также все тело мелких животных. Однако для просветления объемных фиксированных тканей требуется значительное время (часы и дни), поэтому такие методы не могут быть использованы при исследованиях *in vivo*.

Важно отметить, что некоторые контрастные агенты КТ (Omnipaque®, Trazograph®, Hyraque®, Urografin® и др.) улучшают оптическую прозрачность склеры глаза, кожи, хрящевой ткани и некоторых других тканей [6, 8–10, 20, 23, 30–35]. Поскольку КТ-агенты хорошо изучены как эффективные ОПА [8, 20, 34–37], возможна комбинация КТ и оптической визуализации.

Комбинация оптической визуализации и МРТ также потенциально актуальна для мультимодальной визуализации. Любой ОПА должен быть биосовместимым, а многие МРТ-агенты уже широко используются в клинической практике [38–41]. К концу 2009 г. число доз МРТ-агентов, использованных в США, оценивалось в 87.5 млн [40]. Для этого исследования были выбраны Gadovist®, Magnevist® и Dotarem® – агенты, содержащие парамагнитный гадолиний (Gd^{3+}), который обладает наибольшим числом неспаренных электронов среди всех стабильных ионов (семь) и создает высокий электронный спиновый момент, эффективный для усиления протонной релаксации [38–40]. Из этих агентов Magnevist® был разработан в 1988 г. и далее распространен во многих регионах мира. В США макроциклический неионный агент Gadovist® был одобрен в 2011 г., а макроциклический ионный агент Dotarem® – в 2013 г. [41]. Недавно клинически одобренный изоосмолярный КТ-агент на основе иода Visipaque® был предложен в качестве МРТ-агента [42]. На его основе был разработан подход для бимодальной визуализации КТ/МРТ с целью мониторинга доставки и биораспределения липосом, нагруженных Visipaque®.

Следует отметить, что потенциал мультимодальной визуализации сильно зависит от пространственного разрешения каждого из задействованных методов, а также от времени, необходимого для получения изображения. Оптические методы, такие как ОКТ и лазерная флуоресценция, обеспечивают субклеточное разрешение в несколько микрон со скоростью получения изображения от десятков кадров в секунду до одного кадра за несколько минут [1–4]. Пространственное и временное разрешения доклинической МРТ и микро-КТ как минимум в 10 раз ниже. Эти методы дают сопоставимое между собой пространственное разрешение 125 мкм для МРТ-изображений в плоскости и 88 мкм для микро-КТ с изотропным разрешением для животной модели рака [43]. Однако «анато-

мическое» разрешение МРТ сильно зависит от множества переменных, и даже при наиболее сопоставимых режимах визуализации, таких, например, как использование быстрых последовательностей МР-импульсов, получение изображения может потребовать в 5 раз больше времени, чем в случае микро-КТ. Таким образом, при использовании дополнительных мультимодальных подходов следует учитывать специфику каждого из них.

В настоящем исследовании получены и проанализированы временные спектры оптического пропускания и ОКТ-изображения образцов кожи лабораторных мышей *ex vivo* в процессе воздействия контрастных МРТ- и КТ-агентов (Gadovist®, Magnevist®, Dotarem® и Visipaque®). На основе полученных данных найдены коэффициенты диффузии этих агентов, что позволило определить протокол исследования для *in vivo* измерений возбуждаемых импульсным лазером флуоресцентных изображений маркированных опухолевых клеток при местном нанесении наиболее эффективного агента (Gadovist®) на поверхность кожи животного. Эти исследования доказывают эффективность использования контрастных КТ- и МРТ-агентов для ОП в контексте мультимодальной МРТ/КТ/оптической визуализации тканей.

2. Материалы

Оптические измерения проводили на коже *ex vivo* инбредных белых мышей (Саратовский государственный медицинский университет, Россия) и безволосых мышей Nu/Nu (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия). Образцы кожи (10 × 15 мм) были получены путем биопсии у белых мышей после удаления волос с помощью крема для депиляции. Перед измерениями подкожно-жировой слой также был удален пинцетом в максимально возможной степени, чтобы позволить ОПА свободно диффундировать через дермальный слой кожи. Для всех исследований *ex vivo* толщина образца измерялась цифровым микрометром (Fujiisan, Китай) с точностью ~1 мкм до и после насыщения образца кожи контрастным МРТ- или КТ-агентом, используемым в качестве ОПА, и данные усреднялись по трем-пяти измерениям для каждого образца. Исследования на животных были одобрены этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета (протокол №8 от 10 апреля 2018 г.).

В экспериментах по ОП использовали Gadovist® (1.0 ммоль/мл) и Magnevist® (0.5 ммоль/мл) (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Германия), а также Dotarem® (0.5 ммоль/мл) (Guerbet, Франция). Физраствор служил контрольным раствором.

Чтобы доказать концепцию трехмодальной визуализации биоткани на основе одновременного применения МРТ, КТ и оптических методов, был использован иодсодержащий изоосмолярный рентгеновский контрастный агент иодиксанол (1550.2 г/моль) с концентрацией иода 270 мг/мл (Visipaque®, GH Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США).

Для количественной оценки потенциала контрастных МРТ- и КТ-агентов в качестве ОПА измеряли показатели преломления агентов и контрольного физраствора с использованием многоволнового рефрактометра Abbe DR-M2/1550 (ATAGO, Япония) в диапазоне 450–1550 нм при температуре 22.4 ± 1.1 °C. Точность измерения рефрактометра составляет ± 0.0002 единицы показателя преломле-

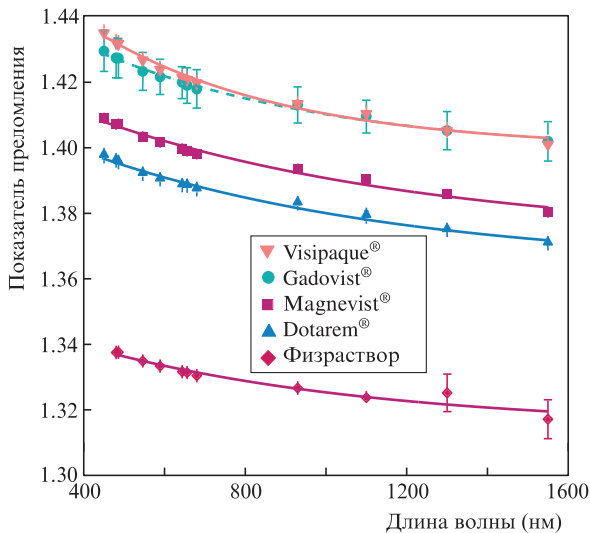


Рис.1. Зависимости показателей преломления контрастных МРТ- и КТ-агентов, а также физраствора от длины волны.

ния. Показатели преломления были измерены три раза для двенадцати длин волн (рис.1).

3. Визуализация тест-объекта и ОКТ-измерения

Цифровая визуализация тест-объекта и ОКТ-измерения были выполнены с использованием образцов кожи белых мышей *ex vivo*. Каждый образец был сфотографирован камерой, оснащенной цветным CMOS-сенсором IMX286 (Sony) с разрешением 3968×2976 (12 мегапикселей) для регистрации различных степеней прозрачности оптически просветленной кожи в U-зоне (участок напечатанной на лазерном принтере аббревиатуры SSU на листе белой бумаги, помещенном непосредственно за образцом ткани). Затем получали изображения в виде В-сканов с помощью системы Spectral Radar ОКТ (ОСР930SR 022,

Thorlabs Inc., США), работающей на длине волны 930 нм со спектральной полосой 100 нм с выходной мощностью пучка излучения 2 мВт. Глубина сканирования и продольное пространственное разрешение на воздухе составляли 1.6 мм и 6.2 мкм соответственно, а поперечное пространственное разрешение равнялось 8 мкм [44]. ОКТ-изображения кожи были записаны со стороны поверхности эпидермиса каждого образца до и после 30 и 60 мин его погружения в растворы агентов или физраствор (контроль). Образцы кожи погружали в чашки Петри с агентами, которые полностью их покрывали.

После получения средних значений в градации серого черной буквы U (I_{\min}) и белой области (I_{\max}), расположенных под образцом кожи, с помощью анализа цифровых изображений с использованием пакета ImageJ (НИН, США) рассчитывали контраст изображения K до и после действия агентов:

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}. \quad (1)$$

Цифровые изображения U-зоны были получены для трех МРТ-агентов (Gadovist®, Magnevist® и Dotarem®) и КТ-агента (Visipaque®), а также для физраствора до погружения образца ткани в агент и через 30 и 60 мин после погружения. Результаты, показанные на рис.2, позволяют визуально оценить эффект ОП. Образцы кожи становятся визуально более прозрачными, при этом наиболее выраженный эффект наблюдается для Gadovist®.

Среднее значение и среднее квадратичное отклонение кратности увеличения контраста изображений после 30 и 60 мин воздействия на кожу мышей МРТ- и КТ-агентов или физраствора, представленные в табл.1, определялись как отношение контраста изображений на рис.2, полученных после 30 и 60 мин воздействия агентов на кожу, к контрасту изображений, полученных до его начала.

На рис.3 показаны В-сканы ОКТ *ex vivo* образцов кожи мыши до и после 30 и 60 мин погружения в растворы ОП. Толщины образцов, измеренные с помощью

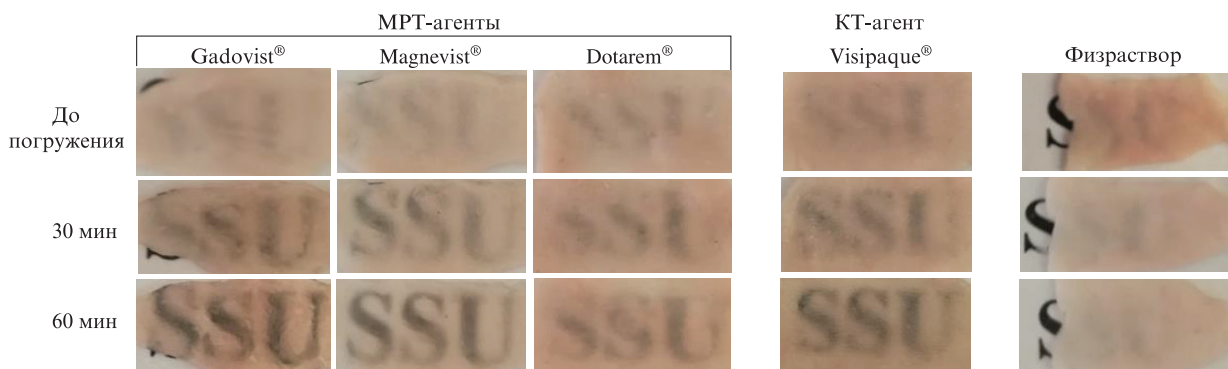


Рис.2. Цифровые изображения тестового объекта, расположенного за образцами кожи белых мышей, при воздействии агентов Gadovist®, Magnevist®, Dotarem®, Visipaque® и физраствора: до погружения и через 30 и 60 мин после погружения образца в раствор.

Табл.1. Средние значения и среднее квадратичные отклонения кратности увеличения контраста изображений после 30 и 60 мин воздействия на кожу белых мышей МРТ- и КТ-агентов или физраствора.

Время (мин)	МРТ-агенты			КТ-агент	Физраствор
	Gadovist®	Magnevist®	Dotarem®	Visipaque®	
30	1.9 ± 0.8	2.0 ± 1.0	2.0 ± 0.6	1.4 ± 2.2	0.6 ± 0.4
60	4.4 ± 1.9	4.9 ± 1.7	2.8 ± 0.4	2.2 ± 2.9	0.7 ± 0.2

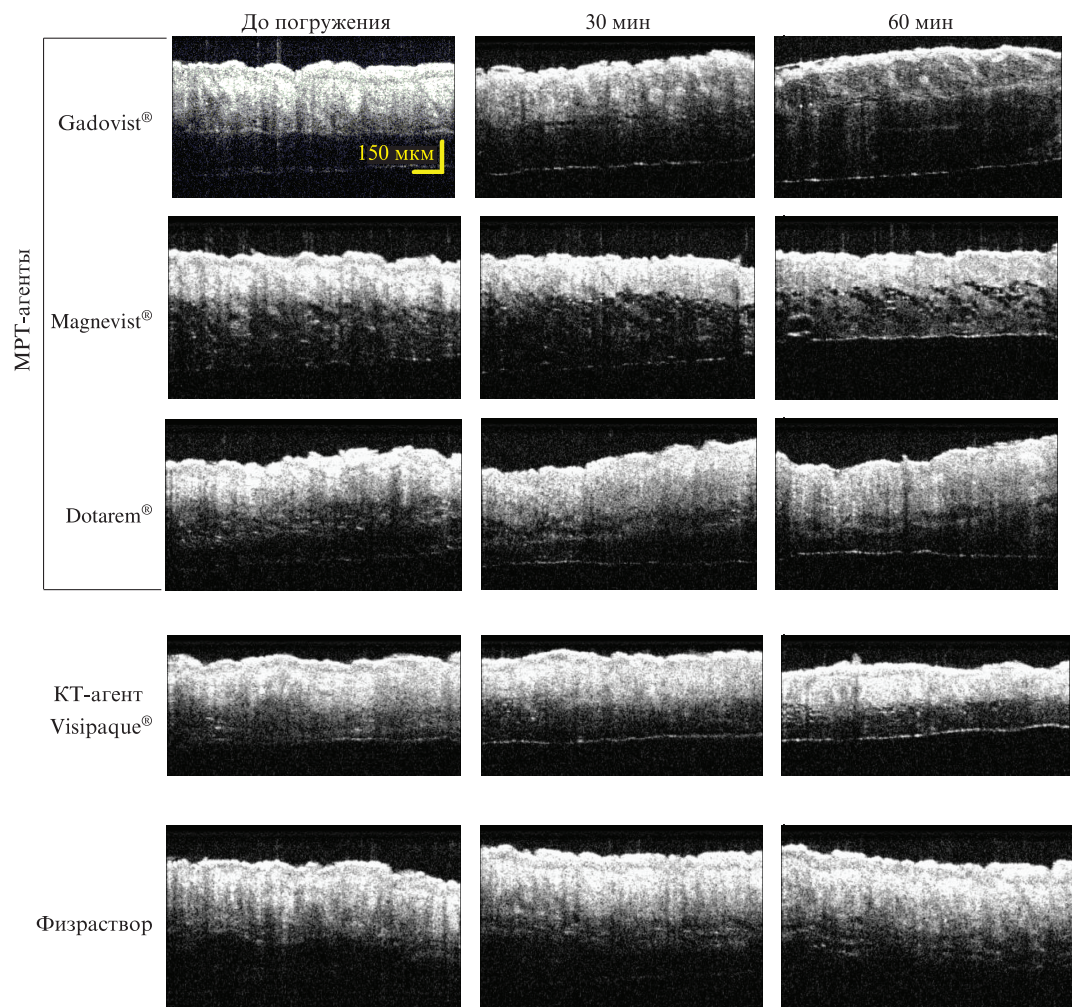


Рис.3. В-сканы ОКТ $[-\lg(R)]$ *ex vivo* образцов кожи белых мышей до и после 30 и 60 мин погружения в растворы контрастных МРТ- и КТ-агентов, а также в физраствор (контроль).

Табл.2. Средние значения и среднеквадратичные отклонения толщины образцов кожи l (в мм), использованных при цифровой (рис.2) и ОКТ-визуализации (рис.3, 4), до и после 60 мин погружения в МРТ- и КТ-агенты или в физраствор.

Время (мин)	МРТ-агенты			КТ-агент	Физраствор
	Gadovist®	Magnevist®	Dotarem®	Visipaque®	
До погружения	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.33 ± 0.07	0.32 ± 0.02
60	0.31 ± 0.02	0.27 ± 0.07	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.07	0.34 ± 0.02

цифрового микрометра до и после погружения в эти растворы, приведены в табл.2.

На рис.4 представлены типичные зависимости ОКТ-сигнала от оптической глубины зондирования кожи мыши до и после погружения образца в раствор Gadovist®. Хорошо видно снижение крутизны зависимости величины ОКТ-сигнала от глубины и увеличение сигнала на больших глубинах (рис.4,б) при увеличении времени иммерсии в этом растворе, что обусловлено уменьшением рассеяния в верхних слоях кожи [3].

После иммерсии кожи в растворе МРТ- или КТ-агента ОКТ-сканирование демонстрирует меньшее рассеяние света в образцах кожи (рис.3, 4). В случае иммерсии в физрастворе наблюдался обратный эффект, т.е. небольшое увеличение рассеяния. По сравнению с физраствором действие контрастных агентов приводит к появлению более детальной структуры кожи и подкожной жировой ткани на ОКТ-изображениях. Возможность наблюдения

более тонкой структуры ткани возникала после 30 и 60 мин воздействия всех исследованных контрастных агентов, но в разной степени. При этом увеличивалась глубина зондирования ткани.

Толщины образцов l , измеренные с помощью микрометра (табл.2), соответствуют данным ОКТ (см. рис.3) с учетом значений среднего показателя преломления образцов ткани n , т.к. при ОКТ измеряется оптическая длина пути (толщина) nl . Отметим, что следует ожидать некоторого увеличения значений n , вызванного проникновением агентов с более высоким показателем преломления (см. рис.1), чем у межтканевой среды (интерстициальная жидкость), с $n = 1.34-1.35$ [3], и некоторой дегидратацией при воздействии агентов Magnevist® и Visipaque® (табл.2). В течение 60 мин после погружения образцов в Gadovist® изменений толщины кожи не наблюдалось, тогда как Magnevist® и Visipaque® вызвали некоторое уменьшение толщины кожи (поперечное стя-

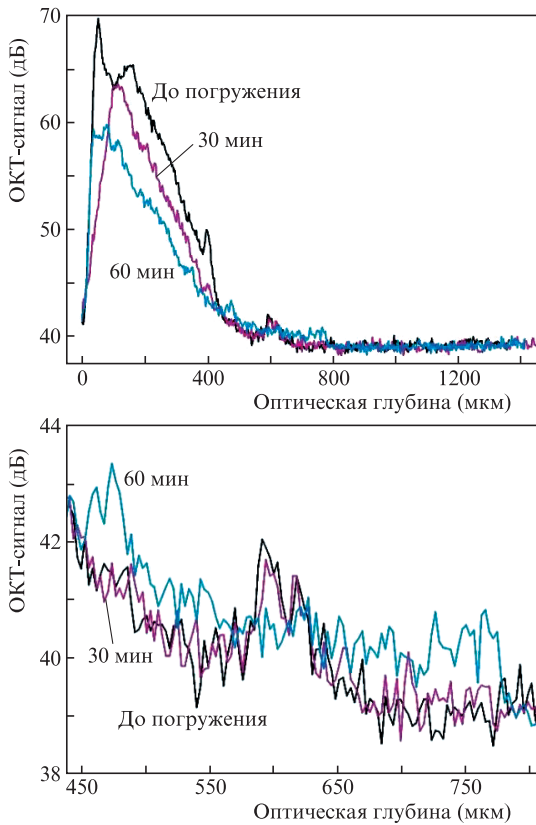


Рис.4. Типичные зависимости ОКТ-сигнала от оптической глубины зондирования кожи мыши до и после 30 и 60 мин погружения образца в раствор Gadovist® (а), а также увеличенный ОКТ-сигнал в области глубин 440–810 мкм (б). Цветной вариант рис.4 представлен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

гивание). Использование МРТ-агента Dotarem®, имеющего высокое содержание воды, или физраствора приводит, наоборот, к некоторому набуханию ткани.

4. Спектральные измерения коллимированного пропускания

Для спектральных измерений коллимированного пропускания использовались образцы кожи безволосых мышей Nu/Nu и белых мышей. Каждый образец кожи фиксировался на пластиковом планшете с отверстием в центре для пропускания света. Планшет помещался в стеклянную кювету с ОПА или физраствором. Кювета с образцом размещалась между двумя оптическими волокнами QR400-1-UV-VIS (Ocean Optics, США) с диаметром сердцевины 400 мкм и коллиматорами 74-ACR (Ocean Optics, США). В качестве источника света использовалась галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США). Все измерения проводились при комнатной температуре (~25°C). Спектры коллимированного пропускания кожи регистрировались каждые 30 или 60 с в течение 60 мин с помощью многоканального спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) (рис.5) [45] в диапазоне длин волн 500–900 нм. Для коррекции шума использовался алгоритм скользящего среднего MATLAB® R2018a. Эти зависимости от времени спектры служили для количественной оценки коэффициентов диффузии агентов в коже с использованием алгоритма, подробно описанного в работах [46, 47]. В дополнение к измерениям толщин образцов (табл.2), что необходимо для правильной работы ал-

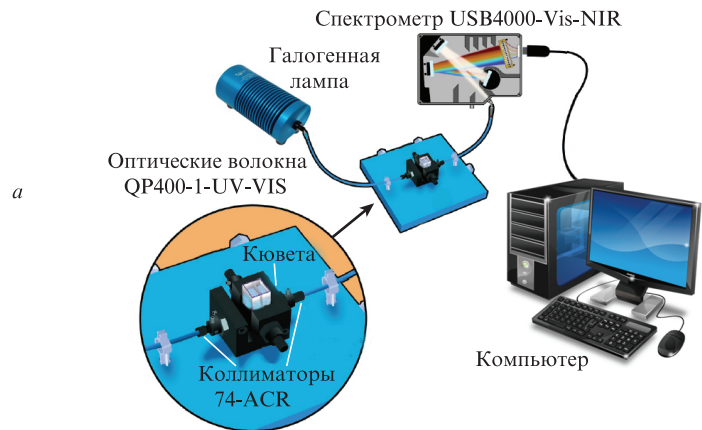


Рис.5. Экспериментальная установка для измерения спектров коллимированного пропускания *ex vivo* образцов кожи, помещенных в контрастные МРТ- или КТ-агенты [45].

горитма, измерялся их вес (с помощью цифровых весов (Scientech, США)) с точностью до 1 мг до и после 60 мин воздействия агента, и данные усреднялись по трем-пяти измерениям, что важно для учета потерь воды в процессе иммерсии при интерпретации результатов измерений.

Эффективные коэффициенты диффузии D_a^{tissue} ОПА в коже мыши были рассчитаны с использованием временных зависимостей коэффициента коллимированного пропускания $T_c(t)$ [47]:

$$T_c(t) \propto 1 - \exp(-t/\tau), \quad (2)$$

$$\tau = \frac{4l^2}{\pi^2 D_a^{\text{tissue}}}, \quad (3)$$

где τ – характерное время диффузии агента при его доставке предпочтительно через одну из поверхностей образца, т. е. через дерму кожи, более проницаемую, чем роговой слой и эпидермис; толщина образца l намного меньше его площади.

Диффузию молекул в тканях можно рассматривать как процесс, которому препятствуют клетки и волокнистые тканевые структуры, что приводит к увеличению длины пути молекул, вызванному их взаимодействием с этими препятствиями. Эта диффузия в тканях, затрудненная по сравнению с диффузией в однородной среде – воде или очень разбавленном геле, а также в тканевой интерстициальной жидкости (ИСЖ (ISF)), количественно определяется извилистостью структуры ткани [48–50]:

$$\frac{l_d}{L} = \sqrt{\frac{D_a^{\text{free}}}{D_a^{\text{tissue}}}}, \quad (4)$$

где D_a^{free} – коэффициент диффузии агента в свободном пространстве; D_a^{tissue} – эффективный коэффициент диффузии, учитывающий удлинение ее пути. Извилистость – это мера геометрической сложности пористой среды, такой как биоткань, и она может быть представлена как отношение длины пути молекулярного потока между двумя точками l_d к прямому расстоянию L между этими точками [51].

С помощью (2) может быть введена эффективность ОП (ЭОП) η , которая определяется как отношение коэффициента коллимированного пропускания T_c^{OC} после завершения процесса ОП к его начальному значению T_c^0 :

$$\eta = T_c^{OC} / T_c^0. \tag{5}$$

Прохождение узкого коллимированного светового пучка через тонкий слой ткани толщиной l описывается законом Бугера–Бера–Ламберта [3]:

$$T_c = I(l) / I_0 = \exp(-\mu_t l), \tag{6}$$

где I_0 и $I(l)$ – интенсивности падающего и прошедшего света соответственно;

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \tag{7}$$

– коэффициенты экстинкции (ослабления) света, его поглощения и рассеяния соответственно. Для мягких тканей в видимом и ближнем ИК диапазонах $\mu_s \gg \mu_a$.

Для многих мягких тканей, состоящих из рассеивателей Ми, для которых фактор анизотропии рассеяния $g \geq 0.9$, а диаметр $2a$ и относительный показатель преломления (ПП) $m = n_s / n_0$ лежат в диапазонах $5 < 2\pi a / \lambda < 50$ и $1 < m < 1.1$ соответственно, коэффициент рассеяния [52, 53]

$$\mu_s = \frac{3.28\pi a^2}{1-g} \rho_s \left(\frac{2\pi n_0 a}{\lambda_0} \right)^{0.37} (m-1)^{2.09}, \tag{8}$$

где ρ_s – объемная плотность рассеивателей; λ_0 – длина волны падающего света; n_s и n_0 – ПП рассеивателей и окружающей среды (например, коллагеновые волокна и ИСЖ) соответственно.

В целом необходимо, чтобы ПП у ОПА был выше, чем у ИСЖ, и как можно ближе к ПП компонентов твердых тканей (рассеивателей), таких как конгломераты белков, липидов и т. д. [3, 27, 29, 30]. Обычно ИСЖ имеет $n = 1.35-1.36$ для $\lambda = 400$ нм и $1.33-1.34$ ($\lambda = 1000$ нм) [27, 52, 54], что близко к ПП воды, который варьируется от 1.34 ($\lambda = 400$ нм) до 1.33 ($\lambda = 1000$ нм) [55].

Чтобы убедиться в том, что исследуемые агенты могут обеспечить необходимую эффективность ОП, сделаем оценки с использованием формулы Гладстона–Дейла для ПП двухкомпонентной смеси и литературных данных для ПП компонентов биотканей и их объемных долей [8, 27]. В частности, для ПП кожи n_{skin} в модели смеси ИСЖ (с долей f_{ISF} и ПП n_{ISF}) и гидратированного твердого (белкового) компонента дермы кожи (с долей $1 - f_{ISF}$ и ПП $n_{protein}$) имеем

$$n_{skin} = n_{ISF} f_{ISF} + n_{protein} (1 - f_{ISF}). \tag{9}$$

Принимая $f_{ISF} = 0.5$ и используя известные данные для n_{skin} [3], получаем $n_{protein} = 1.44$ ($\lambda = 400$ нм) и 1.41 ($\lambda = 1550$ нм). Для скелетной мышечной ткани крысы $n_{protein} = 1.56$ ($\lambda =$

400 нм) и 1.51 ($\lambda = 1000$ нм) [27, 54], а для слизистой оболочки толстой кишки человека $n_{protein} = 1.377$ ($\lambda = 400$ нм) и 1.343 ($\lambda = 1000$ нм) [27, 52]. Эти данные позволяют определить необходимую величину ПП используемого ОПА и связать его с ЭОП (формула (5)).

Из формулы (8) следует, что коэффициент рассеяния ткани очень чувствителен к изменениям относительного ПП m , который изменяется при иммерсии ткани в ОПА. Если положить, что начальному (непросветленному) состоянию образца ткани толщиной l соответствует $\mu_s l = 2$, то, учитывая, что $\mu_s \gg \mu_a$, коэффициент начального коллимированного пропускания образца рассчитывается по формуле (6) как $T_c^0 = 0.14$. Если необходимо получить $\eta = 2.6$ (формула (5)), т. е. увеличить коэффициент пропускания до $T_c^{OC} = 0.37$, нужно обеспечить $\mu_s l = 1$.

Чтобы оценить ПП ОПА, который может обеспечить такую эффективность, в качестве примера возьмем данные для слизистой оболочки толстой кишки человека [52], для которой начальные значения относительного ПП до просветления $m = 1.019$ (400 нм) и $m = 1.013$ (1000 нм). Из формулы (8) нетрудно получить, что после просветления

$$m_{OC} \approx 1 + (m - 1) / \sqrt{2}, \tag{10}$$

т. е. $m_{OC} = 1.0135$ (400 нм) и 1.009 (1000 нм). По данным работы [52] $n_s = n_{protein} = 1.377$ (400 нм) и 1.343 (1000 нм), а $n_0 = 1.351$ (400 нм) и 1.325 (1000 нм). При просветлении ПП ИСЖ изменяется с n_0 на

$$n_0^{OC} = n_0 f_{ISF} + n_{OCA} (1 - f_{ISF}), \tag{11}$$

где f_{ISF} – объемная доля исходной ИСЖ; $1 - f_{ISF}$ – объемная доля ОПА, проникающего в ткань; n_{OCA} – его ПП. Для равных объемных долей ИСЖ и ОПА $f_{ISF} = 0.5$, тогда для получения $\eta = 2.6$ нужно, чтобы $n_{OCA} = 1.367$ (400 нм) и 1.337 (1000 нм). Нетрудно видеть, что все агенты, ПП которых представлены на рис.1, могут обеспечить такую и даже большую эффективность.

На рис.6 показаны зависимости коэффициентов коллимированного пропускания на ряде длин волн для образцов кожи белых мышей и мышей Nu/Nu от времени их иммерсии в различных агентах. Данные, иллюстрирующие ЭОП (5) кожи мыши на отдельных длинах волн после 60 мин иммерсии, просуммированы в табл.3.

Коэффициенты коллимированного пропускания кожи мыши в спектральном диапазоне 540–900 нм значительно увеличиваются, почти до 19 раз, при постепенном насыщении их зависимостей от времени в условиях непрерывного воздействия агентов на образцы в течение 30–40 мин. Наилучший результат был получен для

Табл.3. Эффективности оптического просветления ЭОП (5) кожи мышей после 60 мин воздействия контрастных МРТ-агентов (мыши Nu/Nu) и контрастного КТ-агента (белые мыши).

Длина волны (нм)	$\eta = T_c^{OC} / T_c^0$			КТ-агент Visipaque®
	МРТ-агенты			
	Gadovict®	Magnevist®	Dotarem®	
540	18.87 ± 0.19	8.99 ± 0.18	6.85 ± 0.17	3.54 ± 1.09
600	12.56 ± 0.14	9.18 ± 1.30	4.74 ± 0.28	2.34 ± 0.24
750	8.29 ± 0.04	9.11 ± 0.07	3.80 ± 0.02	2.61 ± 0.18
800	7.21 ± 0.01	9.00 ± 0.20	3.78 ± 0.03	2.69 ± 0.19
900	6.73 ± 0.04	10.60 ± 0.81	4.48 ± 0.05	4.08 ± 0.75

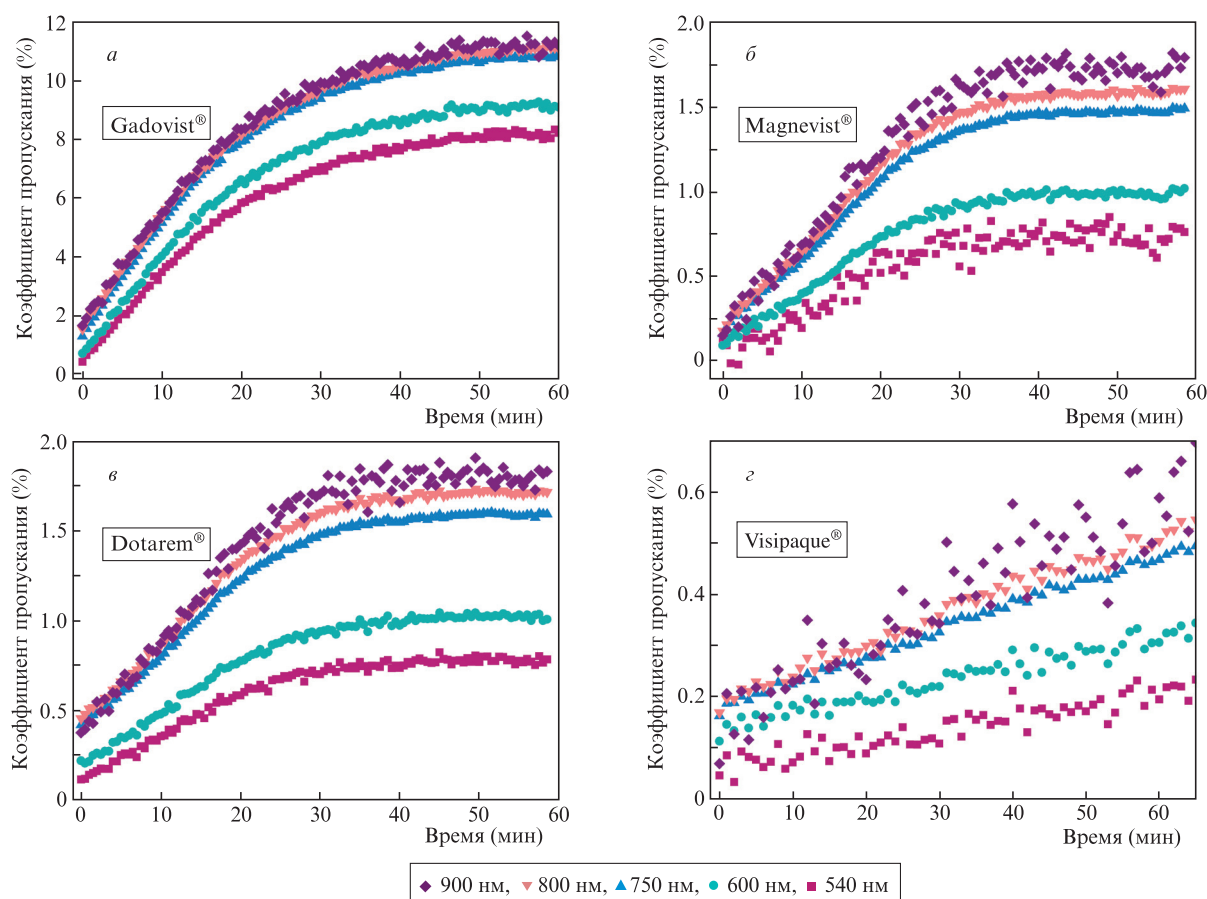


Рис.6. Зависимости коэффициентов коллимированного пропускания образцов кожи мышей Nu/Nu от времени действия контрастных МРТ-агентов Gadovist® (а), Magnevist® (б) и Dotarem® (в), а также образцов кожи белых мышей от времени действия контрастного КТ-агента Visipaque® (з).

Gadovist® (рис.6,а, табл.3) для длин волн 540–600 нм. Коэффициент пропускания образцов кожи мыши на длине волны 540 нм увеличился в 8 раз после первых 10 мин и почти в 19 раз после 60-минутной инкубации в Gadovist®. Для большей длины волны ($\lambda = 600$ нм) использование Gadovist® увеличивало коэффициент пропускания в 5.6 раза в течение первых 10 мин и в 12.6 раза в течение 60 мин воздействия. Важно отметить, что во время ОП не было обнаружено никаких изменений в геометрии или весе образца, который сохранял постоянную толщину 0.27 мм и вес 94 мг (табл.4).

Воздействие на кожу Magnevist® в течение 60 мин также привело к значительному ОП с увеличением коэффициента пропускания в 9–10 раз для всех длин волн (рис.6,б, табл.3). Важно отметить, что на более длинных волнах Magnevist® оказался более эффективным, чем

Gadovist®, что может быть связано с влиянием дополнительного механизма просветления, а именно частичного обезвоживания ткани, вызванного этим агентом (рис.6,б, табл.2–4), поскольку он является ионным агентом с линейной лигандной структурой и более высокой осмолярностью, чем Gadovist® [56–65].

Воздействие Dotarem® также приводит к высокому уровню ЭОП с увеличением коэффициента пропускания в первые 10 мин в 3 раза и почти в 7 раз за 60 мин на длине волны 540 нм (рис.6,в, табл.3). Воздействие Visipaque® вызывает самое слабое увеличение оптического пропускания кожи по сравнению с другими агентами (рис.6). Тем не менее ЭОП для него также довольно высока и составляет 3.5–4.0 для всех длин волн (табл.3). И Dotarem®, и Visipaque® имеют близкие значения ЭОП для длин волн, превышающих 600 нм, которые примерно вдвое

Табл.4. Результаты измерений толщины (l_0, l) и веса (w_0, w) образцов кожи мыши до (l_0, w_0) и после (l, w) погружения в МРТ- и КТ-агенты на 60 мин.

Агенты	l_0 (мм)	l (мм)	w_0 (мг)	w (мг)
Gadovist®	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	94 ± 9	94 ± 8
Magnevist®	0.35 ± 0.05	0.37 ± 0.10	130 ± 25	118 ± 30
Dotarem®	0.32 ± 0.05	0.32 ± 0.05	96 ± 10	102 ± 8
Visipaque®	0.34 ± 0.07	0.39 ± 0.07	70 ± 2	75 ± 2
Физраствор	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.02	84 ± 2	105 ± 2

Примечание. Измерения толщины проводились с помощью цифрового микрометра (Fujisan, Китай). Данные соответствуют результатам спектральных измерений, представленным на рис.6.

меньше, чем в случае Gadovist® или Magnevist®. Для Visipaque® коэффициент пропускания не такой большой, как для Dotarem®, поскольку, как следует из рис.6, начальное пропускание образца кожи, погруженного в Visipaque®, меньше, чем в эксперименте с Dotarem®. В контрольном эксперименте, т.е. для образца, погруженного в физраствор, со временем наблюдалось только небольшое уменьшение коэффициента пропускания из-за набухания ткани.

Первоначальный коэффициент коллимированного пропускания образцов ткани намного меньше для более коротких волн (см. (6)–(8)) из-за более сильного рассеяния света на них [3], что и приводит к большей эффективности ОП на этих длинах волн.

Чтобы иметь возможность определять коэффициент диффузии на основе кинетических кривых (рис.6) с использованием соотношений (2) и (3), измеряли толщину и вес образцов кожи до и после погружения в растворы. В табл.4 приведены средние значения этих параметров. Воздействие Gadovist® толщину и вес образцов не изменяет, Magnevist® и Dotarem® также мало влияют на толщину образцов, но приводят к их незначительной усадке (Magnevist®) или набуханию (Dotarem®), что выражается в небольшом уменьшении или увеличении их веса соответственно (табл.4). Различия в объемной и поперечной усадке/набухании [47] могут быть связаны с различиями в молекулярной структуре (линейной или макроциклической), осмолярности и pH агентов [56–65], к которым структуры коллагена чувствительны из-за их тенденции к сжатию или набуханию [66, 67]. Некоторое поперечное и объемное набухание образцов кожи было обнаружено при воздействии Visipaque®. Следует отметить, что во избежание сильного набухания образцов тканей при использовании агентов время воздействия не должно превышать 60 мин [68].

Основные физико-химические свойства контрастных МРТ-агентов можно найти в [56–65]. Отсутствие заряда в случае неионных агентов (Gadovist®) по сравнению с ионными (Magnevist® и Dotarem®), а также их осмолярность должны потенциально влиять на эффективность ОП и кинетику диффузии. Как показывают полученные кинетические данные, Gadovist® продемонстрировал лучшую способность к ОП, что выражается также в увеличении коэффициента оптического пропускания кожи толщиной 0.27 мм примерно в 3.5–4 раза на длинах волн 750–900 нм через 10 мин после начала воздействия агента (рис.6). Использование Magnevist® показало примерно такое же увеличение коэффициента пропускания на этих длинах волн в течение первых 10 мин, но привело к большему эффекту, чем в случае Gadovist®, при длительном (60 мин) воздействии агентов (см. табл.3).

Используя алгоритм, описываемый уравнениями (2) и (3), из кинетических кривых $T_c(t)$ на рис.6 и с учетом данных для толщины образцов из табл.4 были найдены эффективные коэффициенты диффузии контрастных агентов D_a^{tissue} в коже мышей (табл.5). Важно сравнить полученные данные с измеренными коэффициентами диффузии контрастных МРТ-агентов в других тканях. Обычно такое сравнение проводится с использованием данных для коэффициента свободной диффузии D_a^{free} , который представляет собой коэффициент диффузии агента в однородной среде, такой как вода или ИСЖ [48–50].

Диффузия молекул в тканях – это процесс свободной диффузии, которому препятствуют тканевые структуры.

В связи с этим происходит увеличение длины пути молекулы до l_d по сравнению с длиной пути L в свободной среде, что количественно определяется уравнением (4) как параметр извилистости структуры ткани l_d/L . Для Dotarem® коэффициент $D_a^{free} = (5.18 \pm 1.18) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ при комнатной температуре. Он был пересчитан для физиологической температуры 37°C и составил $(7.96 \pm 1.82) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ [49]. По данным работы [50] $D_a^{free} = 3.9 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ для Gadovist® и $4.5 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ для Dotarem®. Эти значения были использованы для оценки параметра структурной извилистости кожи на основе измеренных эффективных коэффициентов диффузии, представленных в табл.5. Величина определенного таким образом параметра извилистости $l_d/L = 3–3.5$ для кожи является вполне приемлемой по сравнению с более проницаемыми для молекул тканями мозга крысы с оцененной структурной извилистостью 1.2–1.6 [48–50]. Отметим, что полученные в настоящей работе эффективные коэффициенты диффузии МРТ-агентов в коже мышей больше, чем КТ-агента Visipaque®. В частности, измеренный коэффициент диффузии для Dotarem® примерно в два раза больше, чем для Visipaque®, что хорошо соответствует отношению их молекулярных масс $753.9/1550.2$ [56–65], как это следует из зависимости коэффициента диффузии от молекулярной массы агента при диффузии в препаратах мышечных волокон [69].

Табл.5. Эффективные коэффициенты диффузии D_a^{tissue} в коже мышей контрастных МРТ- (мышь Nu/Nu) и КТ-агентов (белые мыши), полученные на основе измерений кинетики коэффициентов коллимированного пропускания (рис.6) и толщин образцов $l \equiv L$ из табл.4, а также оцененный параметр структурной извилистости кожи мыши l_d/L .

МРТ-агенты	КТ-агент	D_a^{tissue} (см ² /с)	D_a^{free} (см ² /с)	l_d/L
Gadovist®		$(4.29 \pm 0.39) \times 10^{-7}$	3.9×10^{-6}	3.0
Magnevist®		$(5.00 \pm 0.72) \times 10^{-7}$	–	–
Dotarem®		$(3.72 \pm 0.67) \times 10^{-7}$	4.5×10^{-6}	3.5
	Visipaque®	$(1.64 \pm 0.18) \times 10^{-7}$	–	–

Примечание. Усреднение проводилось для всех кинетических кривых от 500 до 900 нм. Данные для коэффициента свободной диффузии D_a^{free} взяты из работ [49, 50].

5. Исследование влияния ОП на флуоресценцию экспериментальных опухолей

Для получения ксенотрансплантатов использовали бестимусных мышей Nu/Nu, у которых отсутствует волосяной покров. Адгезионную культуру клеток аденокарциномы гортани человека HEP2, стабильно экспрессирующую белок TagRFP, выращивали в культуральном флаконе в среде RPMI-1640 (Paneco, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Bioclot, Германия) до 70% конфлюэнтности, далее снимали трипсином, отмывали и ресуспендировали в холодном буфере Дульбекко (DPBS) (10^6 клеток в 100 мкл DPBS). Суспензию клеток вводили животным подкожно в правый бок [70].

Флуоресцентные изображения ксенотрансплантатов опухолей мыши получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TE 2000 U, оборудованного системой конфокального сканирования DCS-120 (Becker & Hickl GmbH, Германия), лазером WL-SC-480-6 Supercontinuum и аку-

стооптическим перестраиваемым фильтром AOTF-V1-D-FDS-SM (Fianium, Великобритания), а также гибридным детектором HPM-100-40 (Becker & Hickl GmbH, Германия) (рис.7). Флуоресценция регистрировалась с помощью системы DCS-120, на которую световой сигнал поступал через кварцевую делительную пластинку, а также длинноволновый (HQ 550LP Chroma) и полосовой (580BP40 Omega) фильтры для разделения сигналов возбуждения и флуоресценции. Система DCS-120 основана на многомерном методе коррелированного по времени счета одиночных фотонов (Time-correlated Single Photon Counting, TCSPC), описанном в [71]. Для измерений использовался режим интенсивности (интегральный сиг-

нал) TCSPC, который дает выигрыш в чувствительности за счет подавления фона, поскольку считаются не все пришедшие на ФЭУ фотоны, а только коррелированные со вспышкой.

Исследуемое животное анестезировали путем внутримышечной (ВМ) инъекции с использованием смеси 1:1 Zoletil 50 (Virbac, Франция) и Rometar 2% (Spofa Praha, Чешская Республика), а затем помещали в стандартную кассету для визуализации мелких животных (FMT4, Perkin Elmer, США) и располагали ее на подвижном столике микроскопа (рис.7, в, з). Лазерное излучение с длиной волны 540 нм фокусировали на поверхность кожи мышцы после прохождения через акустооптический пере-

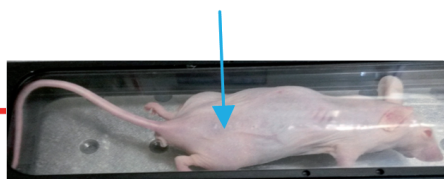
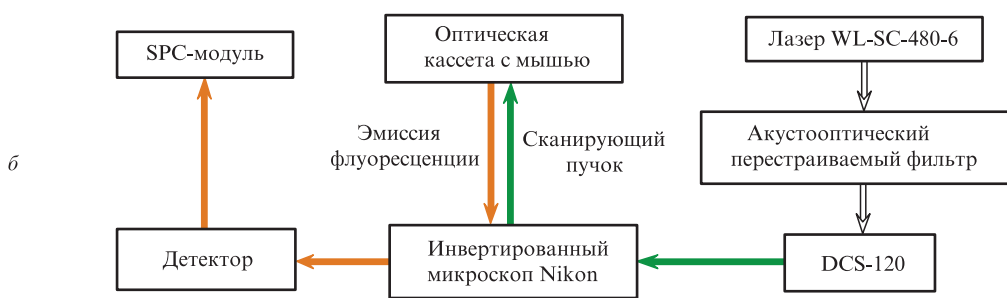
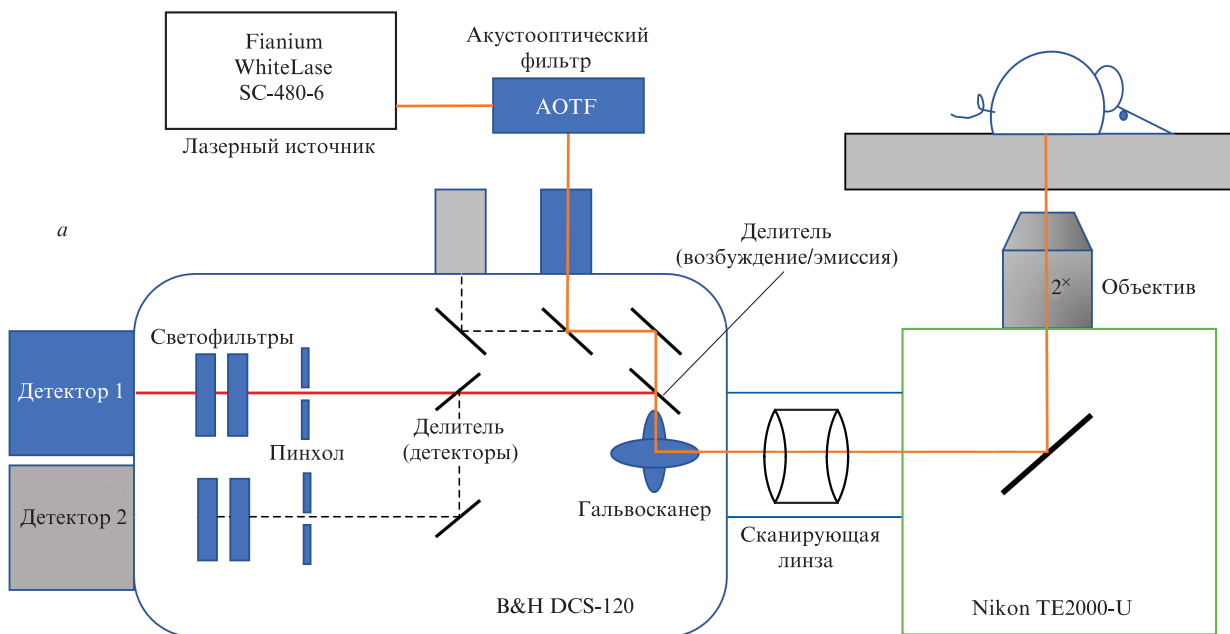


Рис.7. Схема экспериментальной установки для визуализации распределения интенсивности флуоресценции, дополнительный детектор 2 служит для одновременных исследований на второй длине волны (а), функциональная схема экспериментальной установки (б), подвижный столик микроскопа с кассетой, содержащей животное (в), и увеличенное изображение мыши внутри кассеты, стрелка указывает на ксенотрансплантат опухоли (з).

страиваемый фильтр, полосовые оптические фильтры Nikon TRITC EX540/25 нм и ахроматический объектив Nikon 2x plan. Флуоресцентное излучение маркированной TagRFP опухоли собирали через тот же объектив в конфигурации инвертированного режима эпи-освещения (рис. 7) [70, 72].

Флуоресцентные изображения ксенотрансплантата опухоли мыши записывали до ОП, сразу после ОП и затем через 1 ч. После получения первого контрольного изображения кассету с животным открывали и выполняли ОП путем местного нанесения ОПА на область опухоли с использованием тонкого ватного тампона, предварительно пропитанного ОПА (Gadovist®, 1 ммоль/мл, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Германия), в течение 15 мин. После ОП кассету с животным осторожно закрывали и возвращали обратно на подвижный столик для получения второго изображения (сразу после ОП). Настройки измерительной системы обеспечивали практическое совпадение координат первого и второго изображений. Следующие изображения получали каждые 15 мин в течение 60 мин, не открывая кассету. Время сбора данных с целью получения одного изображения для анестезированной мыши составляло от 1 до 2 мин (в зависимости от уровня экспрессии флуорофора). Флуоресцентные изображения анализировали с помощью программы NIH ImageJ 1.48v.

In vivo исследование, цель которого – убедиться в эффективности ОП с применением контрастного МРТ-агента Gadovist®, нанесенного на кожу безволосых мышей Nu/Nu, было выполнено с использованием имплантированной подкожной опухоли и измерения профилей интенсивности флуоресценции маркера TagRFP, экспрессируемого в клетках опухоли HER2-TagRFP.

Полученные изображения в виде распределения интенсивности флуоресценции TagRFP, представленные на рис. 8, хорошо демонстрируют высокую эффективность просветляющего действия МРТ контрастного агента Gadovist® в исследованиях *in vivo*. Эти изображения были зарегистрированы до ОП, через 15 мин и через 1 ч после ОП. Детали профиля интенсивности флуоресценции вдоль линии на изображении опухоли представлены на рис. 9. Там же дано распределение отношения интенсивности флуоресценции к начальному значению измерен-

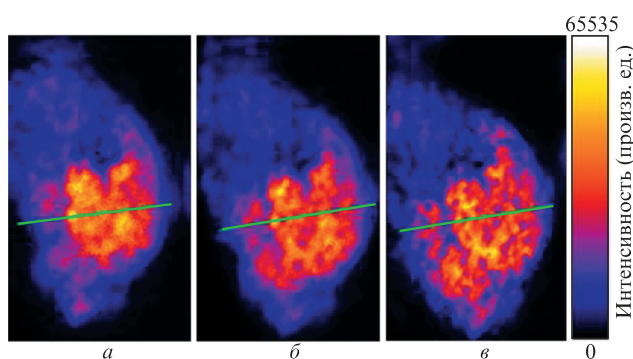


Рис. 8. Распределения интенсивности флуоресценции в подкожном ксенотрансплантате опухоли HER2-TagRFP до (а), сразу после (б) и через 1 ч после (в) местного применения контрастного МРТ-агента Gadovist®. Длина волны возбуждающего света 540 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в спектральной области 560–600 нм, каждое изображение получали в течение примерно 2 мин. Изображения псевдоколерированы при помощи программы ImageJ. Цветные варианты рис. 8–10 представлен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

ного в тех же точках профиля, которое оценивали сразу же и через 1 ч после ОП (рис. 9, б). Распределение этого отношения также было проанализировано в зависимости от исходного уровня флуоресценции опухоли (рис. 9, в). Это позволяет установить тенденции изменения интенсивности флуоресценции в процессе эксперимента. Для участков опухоли со средней или низкой интенсивностью начальной флуоресценции (это небольшие опухолевые

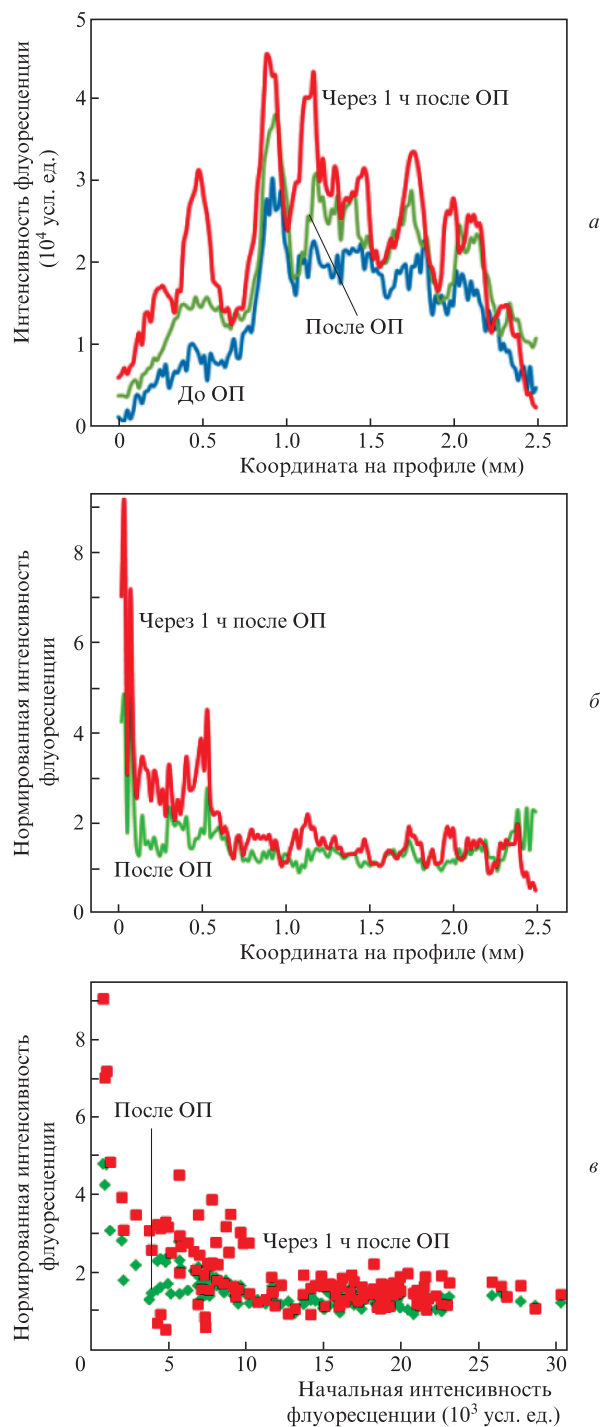


Рис. 9. Распределения интенсивности флуоресценции опухолевого узла HER2-TagRFP вдоль линий на рис. 8 до ОП, сразу после ОП и через 1 ч после ОП: профили интенсивности флуоресценции (а), нормированные на начальную интенсивность флуоресценции профили сразу и через 1 ч после ОП (б) и зависимости нормированной интенсивности флуоресценции от ее начальной интенсивности для тех же профилей (в).

узлы или периферическая область опухоли) ОП вызывает значительное, почти двукратное, увеличение интенсивности флуоресценции опухоли в области координаты 0.5 сразу после нанесения ОПА (рис.9,а). Через 1 ч после ОП интенсивность флуоресценции опухоли уже более чем в 3 раза выше исходного уровня, что хорошо соответствует данным табл.3 для эффективности просветления *ex vivo* кожи с учетом различий в методике нанесения агента, времени его действия и методики оптических измерений. Важно, что и через 1 ч после нанесения на кожу агента он все еще действует, обеспечивая лучшее отношение сигнал/шум и контраст изображения узлов опухоли. Максимально возможная эффективность просветления достигает 7–9 раз (рис.9,б), что хорошо согласуется с данными *ex vivo* измерений (см. табл.3).

В случае средних уровней начальной интенсивности флуоресценции опухоли интенсивность флуоресценции в непериферической области увеличивалась до 1.5 раза сразу после ОП, при этом еще большее увеличение наблюдалось через 1 ч после ОП (рис.9,б). Такие различия в распределении интенсивности флуоресценции после ОП в областях с изначально более низкой интенсивностью можно объяснить разной скоростью диффузии ОПА в центральных и периферических областях опухоли, различной плотностью тканей и сосудистой сети опухоли. В случае более высокой начальной интенсивности флуоресценции в центральных областях опухоли интенсивность флуоресценции при действии агента увеличивается не так сильно (рис.9,а).

Повышение контраста флуоресцентного изображения хорошо видно на другом примере, который представлен на рис.10, где даны распределения интенсивности флуоресценции фрагмента опухолевого очага в области кровеносного сосуда другой мыши с более развитой опу-

холью [73]. Данные рис.10 позволяют оценить контраст изображения сосуда и его кажущийся диаметр до и после ОП. Для оценки контраста K было использовано уравнение (1). Кажущийся диаметр сосуда был определен как полная ширина на полувысоте (FWHM) профилей интенсивности по черным линиям изображений на рис.10,а–в, представленных на рис.10,д. Оказалось, что до ОП диаметр сосуда составлял примерно 200 мкм, а контраст его изображения $K = 0.14$. После 15 мин ОП диаметр сосуда составлял 140 мкм с хорошим контрастом, $K = 0.67$. Это 4.8-кратное увеличение контраста при нанесении агента Gadovist® хорошо согласуется с улучшением контраста, полученным для кожи мышей *ex vivo* в модельном эксперименте, представленном на рис.2 и в табл.1. Через 1 ч после ОП вследствие вымывания ОПА из кожи живой мыши оптические свойства кожи частично возвращаются к исходным уровням рассеяния и флуоресценции. Контраст изображения снижается до 0.27, а кажущийся диаметр сосуда увеличивается до 180 мкм. Обычно для полного прекращения действия ОПА требуются несколько часов [8].

В целом исследования *in vivo* хорошо подтверждают идею о том, что эффективность ОП намного выше при изначально более низкой интенсивности флуоресценции. Как следует из рис.9,б, для малых интенсивностей максимальная эффективность ОП составляет 2–9, что хорошо согласуется с тенденцией, наблюдаемой в исследованиях *ex vivo* (см. табл.3).

Никаких признаков какой-либо системной токсичности для исследуемых животных (включая изменения поведения) после местного применения контрастного МРТ-агента Gadovist® в концентрации 1 ммоль/мл не наблюдалось. Кроме того, во время процедуры ОП и в течение 24 ч после ОП не наблюдалось гиперемии ткани, окружа-

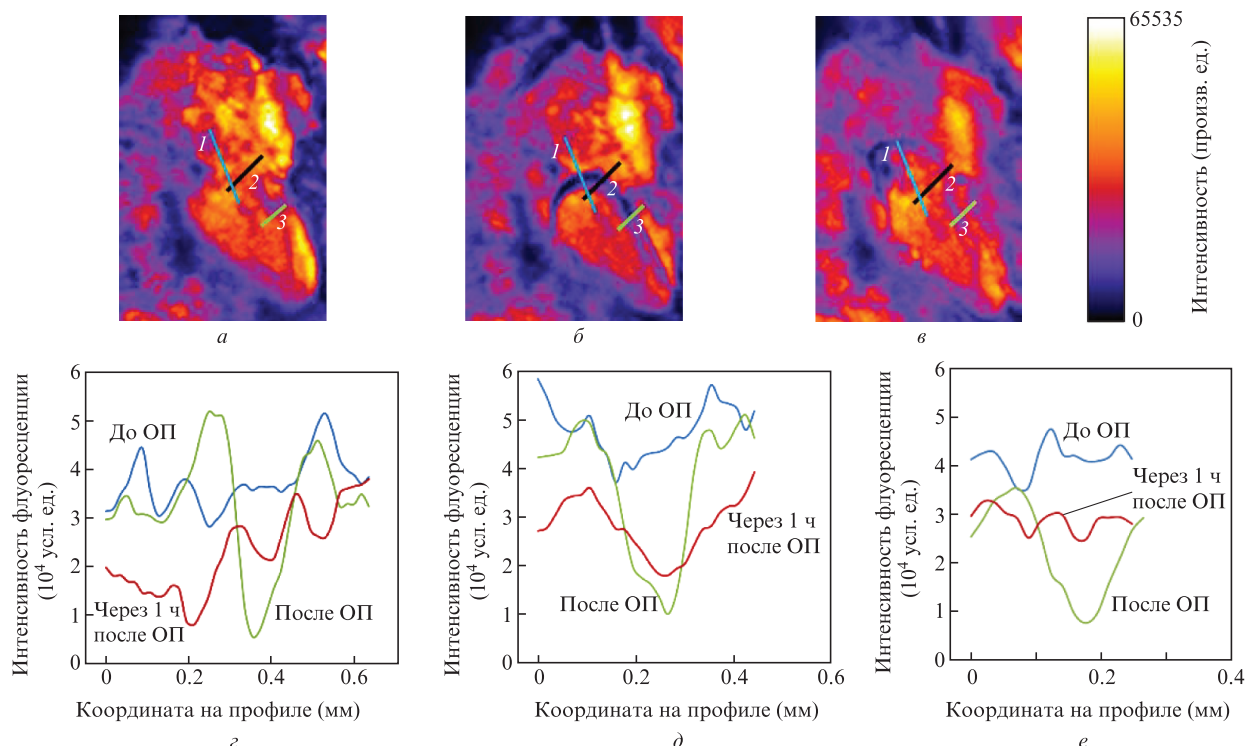


Рис.10. Распределения интенсивности флуоресценции опухолевого очага в области кровеносного сосуда до оптического просветления (а), через 15 мин просветления контрастным МРТ-агентом Gadovist® (б) и через 1 ч после окончания просветления (в); профили распределения интенсивности флуоресценции вдоль голубой 1 (д), черной 2 (е) и зеленой 3 (е) линий на изображениях (а), (б) и (в).

ющей опухоль мышцы. Признаки воспаления в области опухолевой ткани, подвергнутой ОП, во время и после ОП отсутствовали.

6. Обсуждение результатов

В настоящем исследовании несколько клинически доступных контрастных МРТ- и КТ-агентов были изучены с целью определения их эффективности для оптического просветления кожи *ex vivo* и *in vivo*. В исследованиях *in vitro* при химическом фиксировании биотканей относительные объемные доли их компонентов претерпевают значительные изменения; кроме того, происходят внутри- и межмолекулярные сшивки, которые значительно искажают диффузионные свойства тканей, замедляя скорость диффузии молекул [74, 75]. В связи с этим в настоящей работе все исследования проводились на свежих тканях *ex vivo* или *in vivo*.

Основная мотивация исследования заключалась в том, что существующие протоколы ОП, разработанные для оптической визуализации, еще не применялись для мультимодальных методов визуализации тканей и органов, например в сочетании с МРТ, КТ или методом люминесцентного сканирования с использованием возбуждения черенковским излучением (CELSI) [76], а также с другими методами, потенциально предоставляющими множество возможностей для визуализации как структурных, так и функциональных особенностей нормальных и патологических тканей и органов с высоким анатомическим разрешением и молекулярной специфичностью. Клинически одобренный изоосмолярный контрастный КТ-агент на основе иода – иодиксанол (1550.19 г/моль) (Visipaque®) – был включен в настоящее исследование в связи с его эффективностью в качестве контрастного МРТ-агента, что недавно позволило провести тестирование возможности бимодальной визуализации КТ/МРТ с использованием нагруженных иодиксанолом липосом [42].

Помимо оценки эффективности ОП с помощью контрастных МРТ- и КТ-агентов, полученные данные важны для клинических эндоскопических оптических исследований в сочетании с МРТ или КТ, т. е. для мультимодальных диагностических схем.

Измерения показателей преломления всех выбранных агентов показали, что все они достаточно высоки, чтобы обеспечить ОП кожи во всем спектральном диапазоне, выбранном для тестирования (см. рис.1). Было показано, что Gadovist® имеет больший просветляющий эффект, оцененный с помощью как ОКТ-визуализации, так и измерения коэффициента коллимированного пропускания. Кроме того, в отличие от других агентов, инкубация образцов кожи в Gadovist® не приводила к набуханию или усадке ткани, а пилотное исследование, проведенное с использованием ксенотрансплантата опухоли, экспрессирующего флуоресцентный белок TagRFP, показало отличные оптические просветляющие свойства Gadovist® *in vivo*.

Наблюдаемая более низкая эффективность ОП, достигнутая *ex vivo* в случае изоосмолярного КТ-агента Visipaque®, может быть связана с относительно высокой молекулярной массой иодиксанола (1550.19 г/моль) по сравнению с примерно на 50% меньшей массой молекул иогексола (821.14 г/моль), ранее протестированного иодсодержащего КТ-агента Omnipaque®. Сообщалось, что последний улучшает оптическую прозрачность ряда тка-

ней [20, 23, 27, 34–37], а также потенциально может использоваться вместо Visipaque® для визуализации CEST [42]. Хотя эффективность ОП Visipaque® была не такой высокой, как в случае МРТ-агентов, концепция трехмодальной МРТ/КТ/оптической визуализации тканей с использованием контрастных КТ-агентов на основе иода может быть предложена с учетом данных настоящего исследования.

Важно отметить, что основанный на концепции коэффициента свободной диффузии [48–50] простой и надежный оптический метод позволил измерить коэффициенты диффузии МРТ-агентов в коже мышей и сравнить их значения с измеренными в других тканях с помощью МРТ. Такое сравнение позволило оценить параметр извилистости структуры кожи мышей на уровне 3–3.5, вполне приемлемом для ткани с барьерной функцией [66].

Пилотные *in vivo* исследования на ксенотрансплантах опухолей, экспрессирующих флуоресцентный красный белок TagRFP, показали, что интенсивность флуоресценции существенно возрастает после оптического просветления с использованием МРТ-агента Gadovist®, тем самым демонстрируя хорошую перспективу использования контрастных МРТ-агентов в оптической визуализации и в сочетании с МРТ

При использовании МРТ-агента Gadovist® *in vivo* наблюдалось почти пятикратное увеличение контраста флуоресцентного изображения сосудов в области опухоли, что хорошо согласуется с улучшением контраста, полученным *ex vivo* для кожи мыши. Повышенный контраст флуоресцентного изображения позволил реалистично оценить диаметр первоначально скрытой сосудистой структуры. Концепция высокой эффективности ОП для изначально более низкой интенсивности флуоресценции была успешно доказана в исследованиях как *ex vivo*, так и *in vivo*.

Мультимодальные технологии визуализации биотканей с использованием оптических и КТ/МРТ-методов имеют очевидные ограничения, обусловленные физическими принципами каждого из методов. Например, оптические методы не позволяют получать изображения всего тела или отдельного крупного органа, однако делают возможной визуализацию патологии головного мозга, молочной железы, суставов пальцев и полых органов (с применением эндоскопов). Во всех этих случаях оптическое просветление помогает снизить рассеяние и получить более качественное оптическое изображение [3, 33, 77, 78]. Технология введения агента для мультимодальной визуализации должна соответствовать решаемым задачам. Например, для ОКТ/МРТ/КТ-исследований поверхностных органов достаточно будет ввести агент местно [60, 79–81], для комбинированной визуализации более глубоких тканей можно использовать внутритканевую/внутриорганный инъекцию или комбинированное введение – местное и внутритканевое [79, 82, 83]. Возможно также пероральное введение, причем не только для исследования желудочно-кишечного тракта, но и для насыщения других органов с патологией контрастным/просветляющим агентом (в качестве альтернативы внутривенной инъекции) [79, 82–85].

7. Выводы

В настоящей работе впервые описаны оптические и диффузионные свойства контрастных МРТ-агентов и об-

суждается их потенциал с точки зрения оптического просветления биологических тканей, что продемонстрировано с помощью цифровой микроскопии, ОКТ, измерения спектрального коллимированного пропускания и флуоресцентной визуализации. Новые данные, полученные для кожи мышей, могут быть потенциально важными для доклинических и клинических исследований, в которых используется МРТ в сочетании с оптической визуализацией. Следовательно, контрастные МРТ-агенты (на основе гадолиния) могут не только увеличивать контраст МРТ-изображений тканей и органов, но также эффективно уменьшать рассеяние оптического излучения биологическими тканями, что приводит к увеличению контраста и глубины зондирования оптических методов и, в конечном итоге, открывает перспективность использования мультимодальной диагностики с единым агентом. Кроме того, такие агенты способны усиливать интенсивность флуоресценции молекулярных маркеров, экспрессируемых в опухолях *in vivo*.

Поскольку несколько контрастных КТ-агентов также могут обеспечивать повышенный контраст оптических и МРТ-изображений, результаты нашего исследования открывают путь к принципиально новому подходу к мультимодальности, включающему в себя синхронизованные во времени и в пространстве оптическую, МРТ- и КТ-визуализации благодаря тому, что один и тот же агент способен одновременно увеличивать контраст всех трех методов визуализации.

Оптические методы, эффективность которых может существенно возрасти при оптическом просветлении с помощью контрастных МРТ-агентов, не ограничиваются спектральной, ОКТ- и флуоресцентной визуализациями, а включают в себя также конфокальную микроскопию, спектроскопию комбинационного рассеяния, многофотонную микроскопию, фотоакустическую визуализацию и другие.

Работа Д.К.Тучиной и В.В.Тучина поддержана РФФИ (грант №18-52-16025 НЦНИЛ_а), а работа О.А.Синдеевой по подготовке образцов тканей животных для спектральных и ОКТ-измерений поддержана Российским научным фондом (проект №19-75-10043).

Авторы благодарны профессору Луису М.Оливейро за помощь в обработке спектров коллимированного пропускания, доктору Теему Мюллюля за предоставление агента Visiraque® и аспиранту С.М.Зайцеву за помощь в подготовке документов для одобрения исследований на животных Комитетом по этике.

- Akselrod-Ballin A., Dafni H., Addadi Y., Biton I., Avni R., Brenner Y., Neeman M. *Sci. Rep.*, **6**, 27940 (2016).
- Leitgeb R.A., Baumann B. *Front. Phys.*, **6**, 114 (2018).
- Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics* (Bellingham: SPIE, 2015, p. 988).
- Tuchin V.V. (Ed.). *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Light-Tissue Interaction. Methods* (Bellingham: SPIE, 2016, p. 1552).
- García-Martín M.L., López-Larrubia P. (Eds), in *Preclinical MRI. Methods in Molecular Biology* (New York: Humana Press, 2018, p. 441).
- Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. *J. Biomed. Opt.*, **2**, 401 (1997).
- Khan M.H., Choi B., Chess S., Kelly K.M., McCullough J., Nelson J.S. *Lasers Surg. Med.*, **34**, 83 (2004).
- Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood* (Bellingham: SPIE, 2005, p. 256).
- Tuchin V.V. *IEEE J. Select. Top. Quantum Electron.*, **13**, 1621 (2007).
- Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. *Expert Rev. Med. Devices*, **7**, 825 (2010).
- Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A. *Nat. Neurosci.*, **14**, 1481 (2011).
- Erturk A., Mauch C.P., Hellal F., Forstner F., Keck T., Becker K., Jahrling N., Steffens H., Richter M., Hubener M., Kramer E., Kirchoff F., Dodt H.U., Bradke F. *Nat. Med.*, **18**, 166 (2012).
- Erturk A., Becker K., Jahrling N., Mauch C.P., Hojer C.D., Egen J.G., Hellal F., Bradke F., Sheng M., Dodt H.U. *Nat. Prot.*, **7**, 1983 (2012).
- Zhu D., Larin K. V., Luo Q., Tuchin V.V. *Laser Photon. Rev.*, **7**, 732 (2013).
- Susaki E.A., Tainaka K., Perrin D., Kishino F., Tawara T., Watanabe T.M., Yokoyama C., Onoe H., Eguchi M., Yamaguchi S., Abe T., Kiyonari H., Shimizu Y., Miyawaki A., Yokota H., Ueda H.R. *Cell*, **157**, 726 (2014).
- Richardson D.S., Lichtman J.W. *Cell*, **162**, 246 (2015).
- Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. *J. Biomed. Photon. Eng.*, **1**, 22 (2015).
- Pan C., Cai R., Quacquarelli F.P., Ghasemigharagoz A., Loubopoulos A., Matryba P., Plesnila N., Dichgans M., Hellal F., Erturk A. *Nat. Meth.*, **13**, 859 (2016).
- Zhao Q., Dai C., Fan S., Lv J., Nie L. *Sci. Rep.*, **6**, 34954 (2016).
- Ke M.-T., Nakai Y., Fujimoto S., Takayama R., Yoshida S., Kitajima T.S., Sato M., Imai T. *Cell Rep.*, **14**, 2718 (2016).
- Perbellini F., Liu A.K.L., Watson S.A., Bardi I., Rothery S.M., Terracciano C.M. *Sci. Rep.*, **7**, 5188 (2017).
- Qi Y., Yu T., Xu J., Wan P., Ma Y., Zhu J., Li Y., Gong H., Luo Q., Zhu D. *Sci. Adv.*, **5**, eaau8355 (2019).
- Bashkatov A.N., Berezin K.V., Dvoretzkiy K.N., Chernavina M.L., Genina E.A., Genin V.D., Kochubey V.I., Lazareva E.N., Pravdin A.B., Shvachkina M.E., Timoshina P.A., Tuchina D.K., Yakovlev D.D., Yakovlev D.A., Yanina I.Yu., Zhernovaya O.S., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **23**, 091416 (2018).
- Kim J.H., Jang M.J., Choi J., Lee E., Song K.-D., Cho J., Kim K.-T., Cha H.-J., Sun W. *Sci. Rep.*, **8**, 12815 (2018).
- Ochoa L.F., Kholodnykh A., Villarreal P., Tian B., Pal R., Freiberg A.N., Brasier A.R., Motamedi M., Vargas G. *Sci. Rep.*, **8**, 13348 (2018).
- Matryba P., Kaczmarek L., Gołab J. *Laser Photon. Rev.*, **13**, 1800292 (2019).
- Oliveira L.M., Tuchin V.V. *The Optical Clearing Method – A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering* (Switzerland AG, Basel: Springer Nature, 2019, p. 177).
- Wan P., Zhu J., Xu J., Li Y., Yu T., Zhu D. *Neurophoton.*, **5**, 035007 (2018).
- Costantini I., Cicchi R., Silvestri L., Vanzi F., Pavone F.S. *Biomed. Opt. Express*, **10**, 5251 (2019).
- Inyushin M., Meshalkina D., Zueva L., Zayas-Santiago A. *Molecules*, **24**, E2388 (2019).
- Tainaka K., Murakami T.C., Susaki E.A., Shimizu C., Saito R., Takahashi K., Hayashi-Takagi A., Sekiya H., Arima Y., Nojima S., Ikemura M., Ushiku T., Shimizu Y., Murakami M., Tanaka K. F., Iino M., Kasai H., Sasaoka T., Kobayashi K., Miyazono K., Morii E., Isa T., Fukayama M., Kakita A., Ueda H. R. *Cell Rep.*, **24**, 2196 (2018).
- Matsumoto K., Mitani T.T., Horiguchi S.A., Kaneshiro J., Murakami T.C., Mano T., Fujishima H., Konno A., Watanabe T.M., Hirai H., Ueda H.R. *Nat. Prot.*, **14**, 3506 (2019).
- Bykov A., Hautala T., Kinnunen M., Popov A., Karhula S., Saarakkala S., Nieminen M.T., Tuchin V., Meglinski I. *J. Biophoton.*, **9**, 270 (2016).
- Sdobnov A.Yu., Darwin M.E., Lademann J., Tuchin V.V. *J. Biophoton.*, **10**, 1115 (2017).
- Sdobnov A.Yu., Tuchin V.V., Lademann J., Darwin M.E. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **50**, 285401 (2017).
- Alexandrovskaya Yu.M., Evtushenko E.G., Obrezkova M.M., Tuchin V.V., Sobol E.N. *J. Biophoton.*, **11**, e201800195 (2018).
- Sdobnov A.Yu., Darwin M.E., Schleusener J., Lademann J., Tuchin V.V. *J. Biophoton.*, **12**, e201800283 (2019).
- Caravan P., Ellison J., McMurry T., Laufer R. *Chem. Rev.*, **99**, 2293 (1999).
- Lin S.P., Brown J.J. *J. Magn. Reson. Imaging.*, **25**, 884 (2007).
- Alshowiman S.S., Alswailem A.K., Almohizy O.A., Alfawaz A.A., Ibn Alshaiikh A.A. *Int. J. Pharmac. Sci. Inv.*, **7**, 11 (2018).

41. Pierre V.C., Allen M.J., Caravan P. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **19**, 127 (2014).
42. Chen Z., Li Y., Airan R., Han Z., Xu J., Chan K.W.Y., Xu Y., Bulte J.W.M., van Zijl P.C.M., McMahon M.T., Zhou S., Liu G. *Quant. Imaging Med. Surg.*, **9**, 1579 (2019).
43. Pandit P., Johnston S.M., Qi Y., Story J., Nelson R., Johnson G.A. *Acad. Radiol.*, **20**, 430 (2013).
44. Yanina, I.Y., Trunina, N.A., Tuchin, V.V. *J. Biomed. Opt.*, **18**, 111407 (2013).
45. Spectrometer Operating Software Installation and Operation Manual, SpectraSuite®, Document Number 000-20000-300-02-201205, 2009.
46. Tuchin V.V. (Ed.), in *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* (Boca Raton: CRC Press, 2009, p. 587).
47. Tuchina D.K., Shi R., Bashkatov A.N., Genina E.A., Zhu D., Luo Q., Tuchin V.V. *J. Biophoton.*, **8**, 332 (2015).
48. Mériaux S., Conti A., Larrat B. *Front. Phys.*, **6**, 38 (2018).
49. Hagberg G.E., Mamedov I., Power A., Beyerlein M., Merkle H., Kiselev V.G., Dhingra K., Kubíček V., Angelovski G., Logothetis N.K. *Contrast Media Mol. Imaging*, **9**, 71 (2014).
50. Conti A., Magnin R., Gerstenmayer M., Tsapis N., Dumont E., Tillement O., Lux F., Le Bihan D., Mériaux S., Penna S.D., Larrat B. *Contrast Media Mol. Imaging*, 6341545-1–13 (2019).
51. <https://www.glossary.oilfield.slb.com/en/Terms/t/tortuosity.aspx> (viewed on December 20, 2020).
52. Carneiro I., Carvalho S., Silva V., Henrique R., Oliveira L., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **23**, 121620 (2018).
53. Graaff R., Aarnoudse J.G., Zijl J.R., Sloot P.M.A., de Mul F.F.M., Greve J., Koelink M.H. *Appl. Opt.*, **31**, 1370 (1992).
54. Oliveira L.M., Carvalho M.I., Nogueira E.M., Tuchin V.V. *J. Biophoton.*, **11**, e201700094 (2018).
55. <https://refractiveindex.info/?shelf=3d&book=liquids&page=water> (viewed on December 20, 2020).
56. Longo D.L., Michelotti F., Consolino L., Bardini P., Digilio G., Xiao G., Sun P. Z., Aime S. *Invest Radiol.*, **51**, 155 (2016).
57. Laurent S., Vander Elst L., Muller R.N. *Contrast Med. Mol. Imaging*, **1**, 128 (2006).
58. Scott L.J. *Clin. Drug Invest.*, **38**, 773 (2018).
59. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gadovist> (viewed on December 20, 2020).
60. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Magnevist> (viewed on December 20, 2020).
61. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dotareum> (viewed on December 20, 2020).
62. <https://www.bayer.ca/omr/online/magnevist-pm-en.pdf> (viewed on December 20, 2020).
63. <https://www.rxlist.com/dotareum-drug.htm> (viewed on December 20, 2020).
64. <https://www.umassmed.edu/globalassets/radiology/documents/dotareum-info-1.pdf> (viewed on December 20, 2020).
65. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Iodixanol>; <https://www.rxlist.com/visipaque-drug.htm#clinpharm> (viewed on December 20, 2020).
66. Surber C., Abels C., Maibach H. (Eds) *pH of the Skin: Issues and Challenges* (Basel, New York: Karger, 2018).
67. Meyer M. *Biomed. Eng. OnLine*, **18**, 1 (2019); <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>.
68. LaComb R., Nadiarnykh O., Carey S., Campagnola P.J. *J. Biomed. Opt.*, **13**, 021109 (2008).
69. Papadopoulos S., Juergens K.D., Gros G. *Biophys. J.*, **79**, 2084 (2000).
70. Zherdeva V., Kazachkina N.I., Shcheslavskiy V., Savitsky A.P. *J. Biomed. Opt.*, **23**, 035002 (2018).
71. <https://www.becker-hickl.com/wp-content/uploads/2019/06/dcs-hb-8ed-v04f.pdf> (viewed on December 20, 2020).
72. Sarkisyan K.S., Goryashchenko A.S., Lidsky P.V., Gorbachev D.A., Bozhanova N.G., Gorokhovatsky A.Y., Pereverzeva A.R., Ryumina A.P., Zherdeva V.V., Savitsky A.P., Solntsev K.M., Bommarius A.S., Sharonov G.V., Lindquist J.R., Drobizhev M., Hughes T.E., Rebane A., Lukyanov K.A., Mishin A.S. *Biophys. J.*, **109**, 380 (2015).
73. Tuchina D.K., Meerovich I.G., Sineeveva O.A., Zherdeva V.V., Savitsky A.P., Bogdanov A.A. Jr., Tuchin V.V. *J. Biophoton.*, **13**, e201960249 (2020).
74. Jelescu I.O., Budde M.D. *Front. Phys.*, **5**, 61 (2017).
75. Singh H., Bishen K.A., Garg D., Sukhija H., Sharma D., Tomar U. *Dent. J. Adv. Stud.*, **7**, 51 (2019).
76. Pogue B.W., Feng J., LaRochelle E.P., Bruža P., Lin H., Zhang R., Shell J.R., Dehghani H., Davis S.C., Vinogradov S.A., Gladstone D.J., Jarvis L.A. *Nat. Biomed. Eng.*, **2**, 254 (2018).
77. Kolesnikova E.A., Kolesnikov A.S., Zabarylo U., Minet O., Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. *Proc. SPIE*, **9031**, 90310C (2014).
78. Chang C.-H., Myers E.M., Kennelly M.J., Fried N.M. *J. Biomed. Opt.*, **22**, 018002 (2017).
79. Caldemeyer K.S., Stockberger S.M. Jr., Broderick L.S. *AJR*, **171**, 1501 (1998).
80. Atanasijevic T., Bouraoud N., McGavern D.B., Koretsky A.P. *Neuroimage*, **156**, 146 (2017).
81. Zou J., Wang Z., Chen Y., Zhang G., Chen L., Lu J. *World J. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.*, **5**, 180 (2020).
82. Xiao Y.-D., Paudel R., Liu J., Ma C., Zhang Z.-S., Zhou S.-K. *Int. J. Mol. Med.*, **38**, 1319 (2016).
83. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/018956s099lbl.pdf (viewed on December 20, 2020).
84. Jacobs K.E., Behera D., Rosenberg J., Gold G., Moseley M., Yeomans D., Biswal S. *NMR Biomed.*, **25**, 563 (2012).
85. Iijima K., Oshima T., Kawakami R., Nemoto T. *Science*, **24**, 101888 (2021).