

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Исследование оптических характеристик тканей опухоли допированной
золотыми наночастицами при ее нагреве лазерным излучением**

АВТОРЕФЕРАТ
МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ
студентки 2 курса 253 группы
направления 03.03.02 ФИЗИКА
физического факультета

Походиной Ксении Александровны

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

А.Н. Башкатов

Зав. кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

В.В. Тучин

г. Саратов 2017

Введение. Актуальность работы:

За последние десятилетия развитие нанотехнологий достигло больших успехов, в связи с этим открываются новые возможности и перспективы для биологии и медицины. Среди всего разнообразия наноразмерных агентов наибольший интерес для биомедицинских приложений представляют золотые плазмонно-резонансные наночастицы. Это обусловлено, с одной стороны, их уникальными физическими свойствами, а с другой стороны – безопасностью для живых объектов. Уникальность свойств заключается в способности к возбуждению локализованных поверхностных плазмонных резонансов в видимой и ближней ИК-области спектра, что приводит к усиленному поглощению и/или рассеянию лазерного излучения. Оптика наноструктур с плазмонным резонансом широко обсуждается в литературе [Kreibig U. et al 1995, Хлебцов Н.Г. и др. 2008, Матвеевская Н.А. и др. 2006, Haglund R.F. et al 2006].

Золотые плазмонно-резонансные наночастицы используются для оптической визуализации биологических тканей и термического повреждения. Изменяя размер и форму золотых плазмонно-резонансных наночастиц, можно настроить пик резонанса на нужную длину волны в так называемом «терапевтическом окне прозрачности» биологических тканей (700-1300 нм). В этой области основные поглотители биоткани, такие как вода, окси- и дезоксигемоглобин обладают малым коэффициентом поглощения, что позволяет излучению проникать в биоткани на глубину до 10 сантиметров. С другой стороны, современные диодные лазеры также работают в «терапевтическом окне прозрачности», что открывает возможность нагрева биоткани в глубине. Более того, с развитием новых оптических методов прижизненной визуализации биологических тканей появилась возможность неинвазивно контролировать накопление наночастиц внутри биологических тканей, с целью определения времени максимального их накопления в интересующей области для задач лазерной гипертермии.

Гипертермия, как метод термического повреждения биологических тканей, известна еще с древних времен, однако, с появлением современных лазерных систем и развитием нанотехнологий, получила новое развитие. При проведении гипертермии осуществляется нагрев ткани до температуры 41-47°C за десятки минут [Svaasand L.O. et al 1990]. При данной температуре имеет место селективное необратимое повреждение патологических клеток за счет снижения вязкости мембран и денатурации белков (при температуре 47 °C).

Лазерная гипертермия с наночастицами в настоящее время широко апробируется. Предполагается, что наночастицы избирательно

накапливаются в патологическом очаге, в том числе в опухоли, поглощают лазерное излучение и усиливают тем самым лазерный нагрев [Lowery A. R. et al. 2006]. Возможность лазерной гипертермии с применением золотых наночастиц демонстрируется преимущественно на клеточных культурах [Melancon M.P. et al 2008, O'Neal D.P. et al 2004, Loo C. et al 2005]. На экспериментальных опухолях лабораторных животных повреждающий эффект достигается в основном за счет термоабляции ткани [Diagaradjane P., et al 2008, Terentuk et al 2009, Gobin et al 2007]. В то время как особый интерес представляет умеренный режим воздействия с минимальным повреждением здоровых тканей и индукцией апоптоза. Метод лазерной гипертермии биологических тканей с золотыми плазмонно-резонансными наночастицами является перспективным, однако требует углубленного изучения и решения ряда вопросов.

Во-первых, не подобрано оптимальное сочетание наночастицы – лазер. Изучение по оптическим спектрам и расчеты по теории рассеяния Ми [O'Neal D.P. et al 2004, Gobin et al 2007] не дают ответа на вопрос, наночастицы с каким поглощением окажутся более эффективными при нагреве.

Другим важным аспектом проведения лазерной гипертермии является контроль внутренней температуры. Контролируемый нагрев позволит достичь высокого повреждающего эффекта патологической области и избежать при этом некроза здоровой ткани, возникающего при перегреве. Традиционным методом измерения температуры ткани является ИК-термография, обеспечивающая измерение температуры лишь на поверхности объекта. Методы измерения внутренней температуры в основном инвазивны, что является их серьезным недостатком [Van der Zee J et al 1998].

Цель выпускной квалификационной работы - изучить возможности оптической визуализации золотых плазмонно-резонансных наночастиц в биотканях и оценить эффективность лазерной гипертермии биологических тканей с золотыми плазмонно-резонансными наночастицами.

Задачи работы: провести эксперимент и сделать из него выводы, проследить за изменением спектров и проанализировать данные.

Научная новизна работы: проводился эксперимент - допирование опухолевой ткани плазмонно-резонансными наночастицами и облучении ее лазерным излучением ближнего ИК диапазона, после проводились расчёты и сравнения спектров.

Структура и объём ВКР.

Магистерская выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы, состоящего из 67 наименований.

Материалы работы изложены на 56 страницах, содержащих 17 рисунков.

Глава 1 Обзор литературы, посвященная вопросу оптических и термических свойств биотканей (раздел 1.1), оптические свойства и биомедицинское применение плазмонно-резонансных наночастиц (раздел 1.2). Раздел 1.3. освещает методы визуализации накопления золотых плазмонно-резонансных наночастиц в биотканях, а раздел 1.4. рассказывает о термическом воздействии на биологические ткани и роли наночастиц в термотерапии.

Глава 2 Материалы и методы содержит 3 подпункта

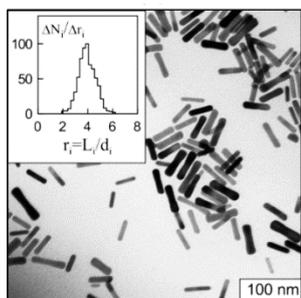
2.1. Объекты исследования

Золотые наночастицы

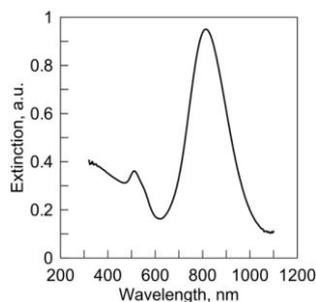
Золотые наностержни были синтезированы в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов, Москва) [16]. Для предотвращения агрегации наночастиц в биоткани и улучшения их биосовместимости используемые наночастицы были функционализированы тиолированным полиэтиленгликолем (молекулярный вес 5000 Да, Nektar, США).

Геометрические параметры золотых наностержней и их изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии,

представлены на рисунке 1(а). Размер наностержней составлял 41 ± 8 нм в длину и 10 ± 2 нм в диаметре. Концентрация в суспензии составляла 400 пг/мл, что соответствовало оптической плотности 20 на длине волны 800 нм. Перед измерением коэффициента экстинкции суспензия разбавлялась 1:10. Спектр коэффициента экстинкции представлен на рисунке 1(б).



а



б

Рисунок 1 - а) Изображение наностержней, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Вставка на рис. 1(а) показывает гистограмму распределения частиц $\Delta N_i / \Delta r_i$ относительно $r_i = L_i / d_i$ со средним значением $r_i = 4.03 \pm 0.7$. б) Спектр экстинкции суспензии золотых наностержней с оптической плотностью 2.

Лабораторные животные

В работе использовались самцы аутбредных крыс-альбиносов весом 160-200 г. Для получения модельных опухолей крысам имплантировалось 0.5 мл 25% суспензии клеток альвеолярного рака почки РА, полученная из банка опухолевых штаммов Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва, Россия). При достижении опухолью диаметра 3.0 ± 0.3 см³ животные случайным образом разделялись на контрольную группу, и группу в которой животные подвергались плазмонной ФТТ. Перед ФТТ крысы были анестезированы с помощью Zoletil 50 (Virbac, Франция), доза препарата составляла 0.05 мг/кг. Эксперименты с животными выполнялись совместно с сотрудниками Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского.

2.2. Оборудование

Диодный лазер LS-2-N-808-10000 (Laser Systems, Ltd., С.-Петербург, Россия)

Для облучения опухоли использовался диодный лазер LS-2-N-808-10000 (Laser Systems, Ltd., С.-Петербург, Россия) с генерацией на длине волны 808 нм и плотностью мощности 2.3 Вт/см². Площадь пятна облучения составляла ~0.5 см². Время облучения 7.5 мин.

ИК визуализатор IRI4010 (IRYSYS, Великобритания)

В процессе облучения температура на поверхности кожи над опухолью регистрировалась с помощью ИК визуализатора IRI4010 (IRYSYS, Великобритания).

Спектрофотометр UV-3600 (Shimatzu, Япония)

Измерения полного пропускания и диффузного отражения проводились в диапазоне длин волн 350 – 2200 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimatzu, Япония) с интегрирующей сферой LISR-3100 (Shimatzu, Япония).

2.3. Методы и методики исследования

За час до проведения ФТТ животному интратуморально (внутри опухоли) вводили суспензию золотых наностержней с трёх точек струйно по 1 мл со скоростью инъекции 0.1 мл/мин. Ранее было показано, что данная методика введения приводит к накоплению и продолжительному задерживанию наночастиц в тканях опухоли.

Для облучения опухоли использовался диодный лазер LS-2-N-808-10000 (Laser Systems, Ltd., С.-Петербург, Россия) с генерацией на длине волны 808 нм и плотностью мощности 2.3 Вт/см². Площадь пятна облучения составляла ~0.5 см². Время облучения 7.5 мин.

В процессе облучения температура на поверхности кожи над опухолью регистрировалась с помощью ИК визуализатора IRI4010 (IRYSYS, Великобритания) каждые 0.5 мин. Динамика изменения температуры представлена на рисунке 2.

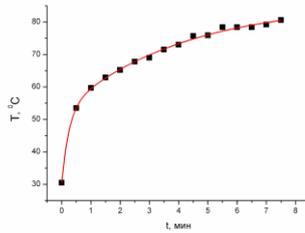


Рисунок 2 - Зависимость температуры кожи в области опухоли от времени при сенсбилизации опухоли золотыми наностержнями и облучении лазером на длине волны 808 нм. Символы соответствуют экспериментальным данным, кривая является аппроксимацией экспериментальной зависимости (ур. 1).

На рисунке хорошо видно, что в течение 7.5 минут температура увеличилась в 2.6 раза. Изменение температуры опухоли с течением времени хорошо описывается двухэкспоненциальной зависимостью:

$$y = A_1 \exp -t/\tau_1 + A_2 \exp -t/\tau_2 + y_0, \quad (1)$$

где A_1 и A_2 – эмпирические константы, τ_1 и τ_2 – характеристические времена процессов нагрева ткани, y_0 – максимальный уровень сигнала. Характеристические времена принимают значения $\tau_1 = 0.24 \pm 0.05$ мин и $\tau_2 = 4.07 \pm 0.6$ мин. y_0 принимает значение 85.8°C .

Существование двух характеристических времён нагрева ткани говорит о том, что процесс нагрева можно разделить на два: быстрый нагрев частиц, находящихся внутри ткани опухоли и, соответственно самой опухоли, и более медленный нагрев ткани окружающей опухоль.

На второй день после проведения плазмонной ФТТ животные выводились из эксперимента. В контрольной группе суспензия наночастиц не вводилась и лазерного воздействия не проводилось. Опухоль удалялась, и из опухоли вырезались следующие образцы (сверху вниз):

- 1) кожа над опухолью, 2) мышечная ткань над опухолью, 3) капсула опухоли, 4) опухолевая ткань на периферии, 5) опухолевая ткань в центре опухоли, 6) мышечная ткань под опухолью. Эти образцы составляли I группу (контроль).

В группе подвергавшейся действию плазменной ФТТ из каждой опухоли последовательно вырезалось четыре образца:

1) слой кожи в области лазерного воздействия, 2) капсула опухоли, 3) опухолевая ткань на периферии, 4) опухолевая ткань в центре опухоли. Эти образцы составляли II группу.

Все образцы помещались между покровными стёклами и закреплялись без сдавливания. Толщина образцов измерялась микрометром с точность ± 10 мкм в пяти точках на периферии и в центре образца, результаты усреднялись, и рассчитывалось среднеквадратичное отклонение.

Измерения полного пропускания и диффузного отражения проводились в диапазоне длин волн 350 – 2200 нм на спектрофотометре UV-3600 (Shimatzu, Япония) с интегрирующей сферой LISR-3100 (Shimatzu, Япония). Обработка результатов измерений (расчет коэффициента поглощения, транспортного коэффициента рассеяния, коэффициента рассеяния и фактора анизотропии рассеяния) проводилась с использованием алгоритма представленного в работе [Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Рубцов В.С., Колесникова Е.А., Тучин В.В. Оптические свойства тканей толстой кишки человека в спектральном диапазоне 350-2500 нм // Квантовая Электроника, Т. 44, № 8, С. 779-784, 2014].

3. Результаты и обсуждение

На рис. 3-6 представлены оптические параметры тканей опухоли и окружающих ее тканей без введения наночастиц и лазерного воздействия. На рис. 3 показаны спектры поглощения кожи над опухолью, мышечной ткани над опухолью, капсулы опухоли, опухолевой ткани на периферии опухоли, опухолевой ткани в центре опухоли, и мышечная ткань под опухолью. Из рисунка хорошо видно, что у всех исследованных типов ткани явно проявляются полосы поглощения гемоглобина (в деоксигенированной форме) крови (λ_{\max} ~420-425 нм и 550-555 нм) и воды (λ_{\max} ~1450 нм и 1930-1950 нм), причем максимальное поглощение наблюдается непосредственно в

опухолевой ткани. Минимальное поглощение наблюдается в тканях кожи и слое мышечной ткани над опухолью.

На рис. 4 представлены спектры транспортного коэффициента рассеяния $\mu'_s = \mu_s (1 - g)$, где μ_s - коэффициент рассеяния и g - фактор анизотропии рассеяния. Из рисунка видно, что в целом рассеяние спадает с ростом длины волны, что соответствует стандартным представлениям теории светорассеяния, с искажением формы спектра в области сильных полос поглощения, что связано с влиянием мнимой части комплексного показателя преломления в данной спектральной области.

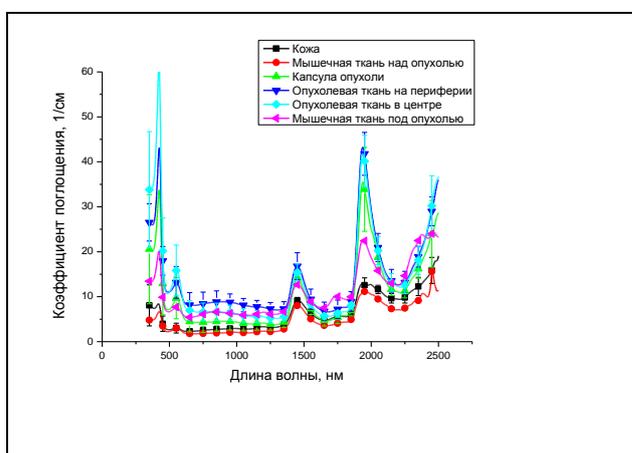


Рис. 3. Спектры поглощения тканей опухоли и окружающих ее тканей

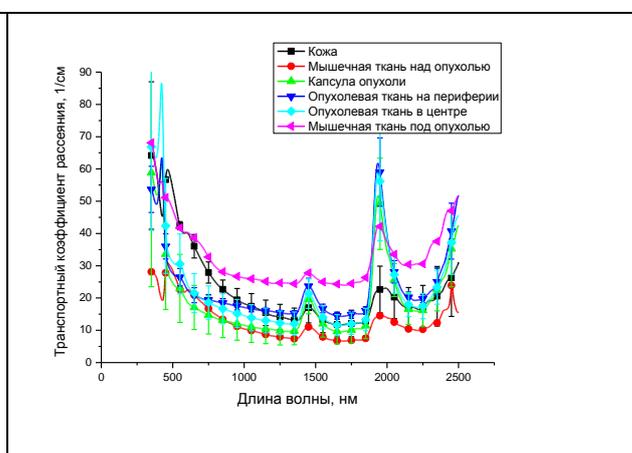


Рис. 4. Спектры транспортного коэффициента рассеяния тканей опухоли и окружающих ее тканей

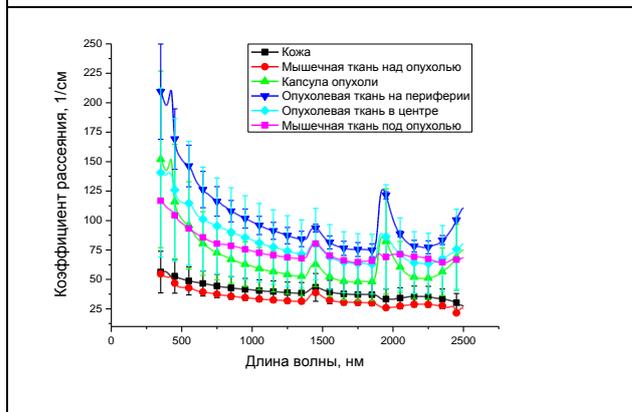


Рис. 5. Спектры коэффициента рассеяния тканей опухоли и окружающих ее тканей

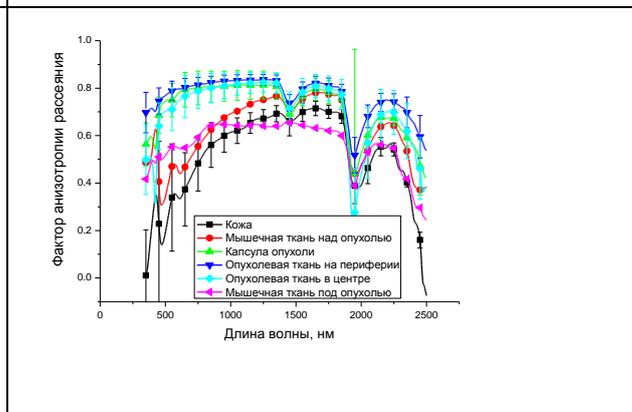


Рис. 6. Спектральная зависимость фактора анизотропии рассеяния тканей опухоли и окружающих ее

На рис. 5 представлены спектры коэффициента рассеяния тканей опухоли и окружающих ее тканей. Из приведенного рисунка хорошо видно, что, как и для транспортного коэффициента рассеяния, коэффициент рассеяния убывает с ростом длины волны. Максимальное светорассеяние наблюдается для тканей опухоли, в то время как минимальное для тканей кожи и слоя мышечной ткани, лежащей над опухолью.

Интересно отметить различия в поглощении и рассеянии слоев мышечной ткани, расположенных выше и ниже опухоли, что, по-видимому, связано с характерным метаболизмом опухолей.

На рис. 6 показана спектральная зависимость фактора анизотропии рассеяния тканей опухоли и окружающих ее тканей. Максимальные значения фактора анизотропии наблюдаются для тканей опухоли, что свидетельствует о том, что светорассеяние в опухоли определяется достаточно крупными рассеивателями, в то время как минимальные для тканей кожи и слоя мышечной ткани, лежащей над опухолью.

На рисунках 7-10 показаны оптические характеристики тканей опухоли и окружающих ее тканей, измеренные после введения наночастиц и лазерного нагрева.

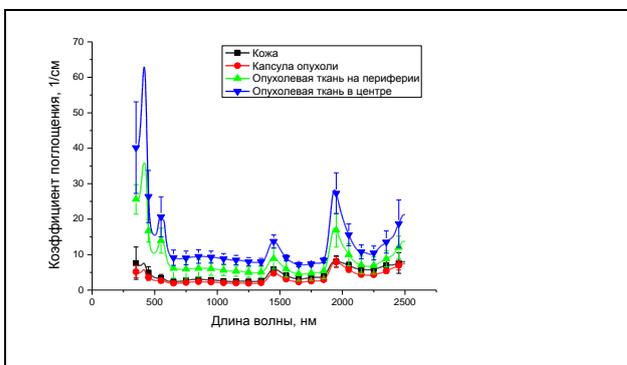


Рис. 7. Спектры поглощения тканей опухоли и окружающих ее тканей после лазерного нагрева

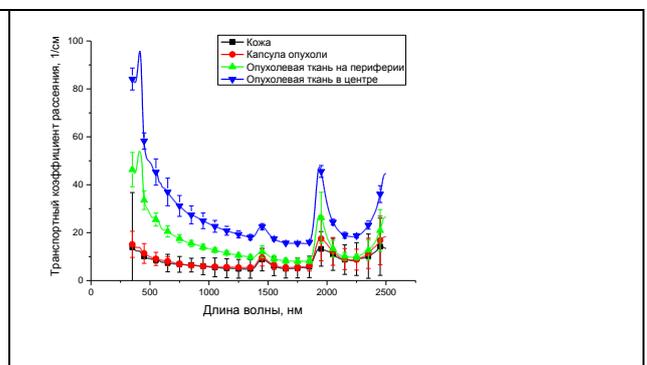
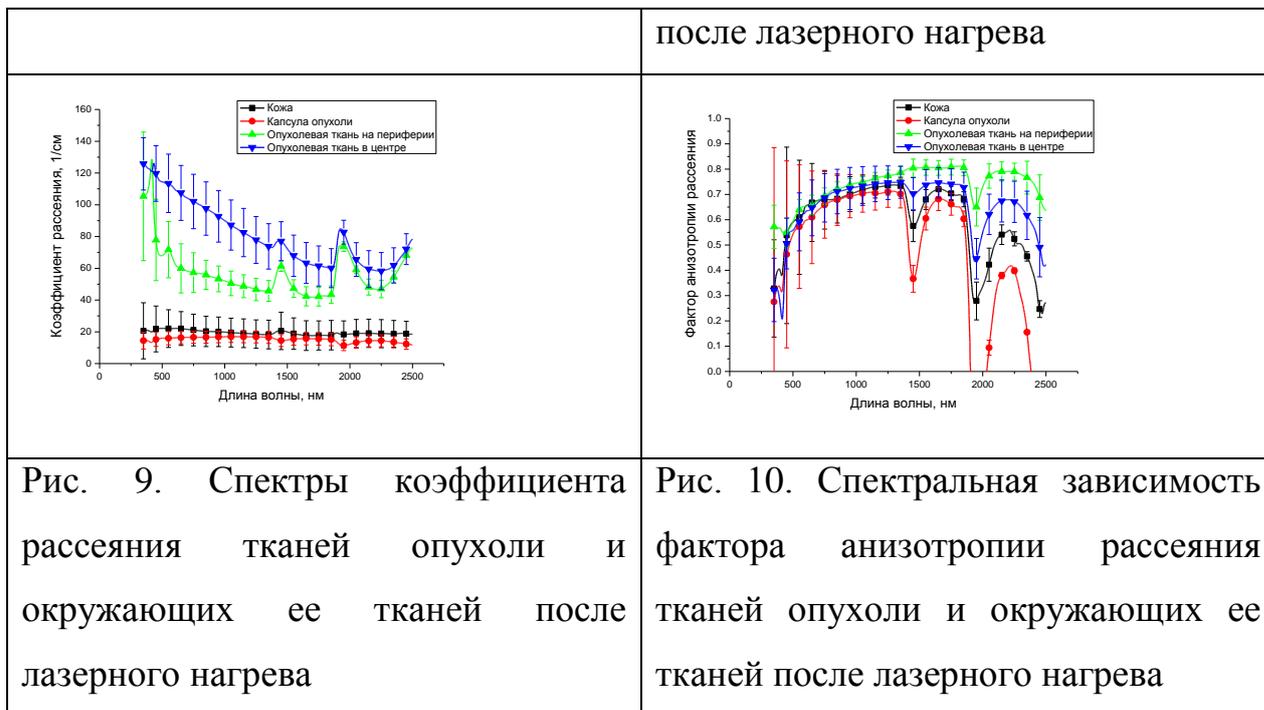


Рис. 8. Спектры транспортного коэффициента рассеяния тканей опухоли и окружающих ее тканей



На рис. 9 представлены спектры поглощения тканей опухоли, измеренные до и после лазерного фототермолиза. Из приведенного рисунка видно, что для всех исследованных типов тканей, после нагрева наблюдается снижение коэффициента поглощения, причем это особенно наглядно проявляется в области полос поглощения воды с максимумами на 1450 и 1930-1950 нм.

На рис. 10 представлены спектры коэффициента рассеяния опухоли и окружающих ее тканей, измеренные до и после лазерного термолиза. Хорошо видно, что лазерный фототермолиз вызывает существенное снижение коэффициента рассеяния, за исключением центральной части опухоли, что, по-видимому, связано с малой плотностью мощности излучения в центре опухоли.

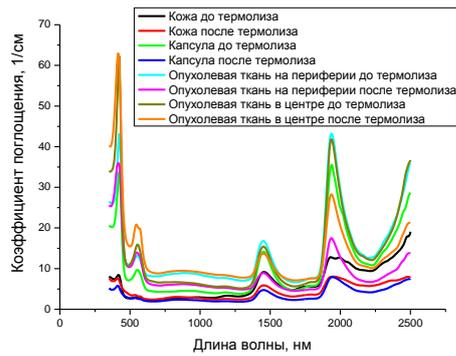


Рис. 9. Спектры поглощения опухоли и окружающих ее тканей, измеренные до и после лазерного термоллиза

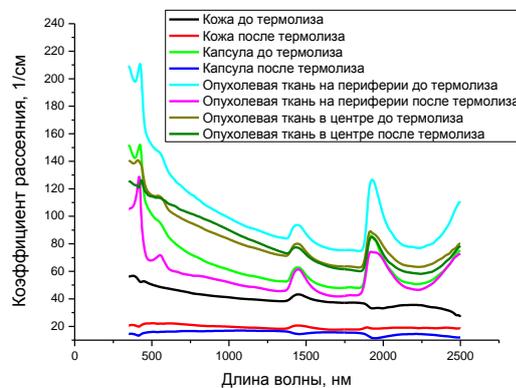


Рис. 10. Спектры рассеяния опухоли и окружающих ее тканей, измеренные до и после лазерного термоллиза

Рисунок 11 показывает спектральную зависимость фактора анизотропии рассеяния опухоли и окружающих ее тканей, измеренные до и после лазерного термоллиза. Из приведенных данных видно, что для всех типов ткани, за исключением кожи над опухолью в зоне нагрева, наблюдается снижение фактора анизотропии. Рост фактора анизотропии рассеяния в зоне нагрева, по-видимому, связан с коагуляционными процессами в ткани, поскольку кожа находится непосредственно в зоне облучения. В более глубоко лежащих слоях, по-видимому, происходит разрушение структурных элементов биотканей, что приводит к образованию более мелких рассеивателей и уменьшению фактора анизотропии рассеяния.

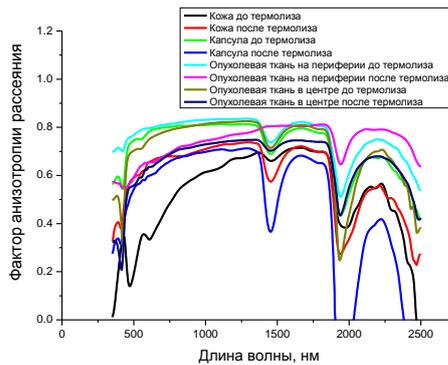


Рис. 11. Спектральная зависимость фактора анизотропии рассеяния опухоли и окружающих ее тканей, измеренные до и после лазерного термолиза

Заключение

В итоге проведенного исследования оптических характеристик тканей опухоли допированной золотыми наночастицами при ее нагреве лазерным излучением были сделаны следующие выводы:

1. В процессе облучения на поверхности кожи над опухолью, мы видим что процесс нагрева можно разделить на два: быстрый нагрев частиц, находящихся внутри ткани опухоли и, соответственно самой опухоли, и более медленный нагрев ткани окружающей опухоль.
2. Из анализа оптических параметров тканей опухоли и окружающих ее тканей без введения наночастиц и лазерного воздействия видно, что:
 - максимальное поглощение наблюдается непосредственно в опухолевой ткани. Минимальное поглощение наблюдается в тканях кожи и слое мышечной ткани над опухолью;
 - рассеяние спадает с ростом длины волны, что соответствует стандартным представлениям теории светорассеяния, с искажением формы спектра в области сильных полос поглощения, что связано с влиянием мнимой части комплексного показателя преломления в данной спектральной области.
3. Максимальные значения фактора анизотропии наблюдаются для тканей опухоли, что свидетельствует о том, что светорассеяние в

опухоли определяется достаточно крупными рассеивателями, в то время как минимальные для тканей кожи и слоя мышечной ткани, лежащей над опухолью.

4. Для всех исследованных типов тканей (до и после лазерного фототермолиза), после нагрева наблюдается снижение коэффициента поглощения, причем это особенно наглядно проявляется в области полос поглощения воды с максимумами на 1450 и 1930-1950 нм.
5. Лазерный фототермолиз вызывает существенное снижение коэффициента рассеяния, за исключением центральной части опухоли, что, по-видимому, связано с малой плотностью мощности излучения в центре опухоли.
6. Из спектральной зависимости фактора анизотропии рассеяния опухоли и окружающих ее тканей, измеренных до и после лазерного термолиза, видно, что для всех типов ткани, за исключением кожи над опухолью в зоне нагрева, наблюдается снижение фактора анизотропии. Рост фактора анизотропии рассеяния в зоне нагрева связан с коагуляционными процессами в ткани, поскольку кожа находится непосредственно в зоне облучения. В более глубоко лежащих слоях происходит разрушение структурных элементов биотканей, что приводит к образованию более мелких рассеивателей и уменьшению фактора анизотропии рассеяния.

Полученные результаты показывают, что при допировании опухолевой ткани плазмонно-резонансными наночастицами и облучении ее лазерным излучением ближнего ИК диапазона происходит снижение как поглощающих, так и рассеивающих параметров опухоли и окружающих ее тканей, что должно приводить к увеличению глубины проникновения лазерного излучения вглубь опухоли и большему ее поражению. В тоже время видно, что, несмотря на достаточно большую температуру на поверхности (порядка 80°C) изменения в центре опухоли незначительны и,

следовательно, для лучшего терапевтического эффекта требуется либо увеличение мощности падающего излучения, либо большее время облучения, либо снижение рассеяния тканей, расположенных над опухолью.