

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФАНТОМОВ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки магистратуры 2 курса 209 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»
профиль «Материаловедение фармацевтического и медицинского назначения»
факультета нано- и биомедицинских технологий

Козловой Анастасии Андреевны

Научный руководитель

доцент, к.х.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

О.А. Иноземцева

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

профессор, д.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.Б. Вениг

инициалы, фамилия

Саратов 2020

Введение. Как известно, большинство летальных случаев вследствие раковых заболеваний обусловлено возникновением метастазов в результате циркуляции в кровотоке опухолевых клеток, распространяющихся от первичной опухоли к жизненно важным органам и тканям. Несмотря на прогресс в использовании циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в качестве прогностического маркера, роль этих клеток в ранней диагностике рака еще не вполне ясна из-за низкой чувствительности существующих методов их детектирования при проведении соответствующих диагностических анализов.

Широкий спектр исследований в настоящий момент направлен на разработку и совершенствование неинвазивных методов диагностики: магнитно-резонансная томография, спектроскопия, проточная цитометрия [1], различные виды микроскопии, спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), а также комбинации указанных методов для повышения эффективности диагностики. Наряду с этим, фотоакустика (ФА) демонстрирует значительный потенциал возможных применений по сравнению со многими оптическими методами, обеспечивая: большую глубину проникновения в биологические ткани до 1 см [2], неинвазивность [3-9] и безопасность использования, направленную терапию (терапию и диагностику) [10] ЦОК и мониторинг эффективности терапии.

Несмотря на то, что в последнее время фотоакустическая проточная цитометрия (ФАПЦ) продемонстрировала перспективность для ранней *in vivo* неинвазивной диагностики рака, инфекций (например, малярии и бактериемии), серповидноклеточной анемии и сердечно-сосудистых осложнений, эта универсальная диагностическая платформа требует доработки, оптимизации и создания методов калибровки прототипов ФАПЦ для использования в клинических условиях. Для этого необходимо разработать фантомы клеток меланомы, с достаточной точностью моделирующие реальные объекты по оптическим и спектральным свойствам, которые могут быть использованы для метрологического обеспечения клинических применений ФАПЦ. В связи с

вышесказанным, можно сформулировать цель и задачи данной квалификационной работы.

Цель работы: разработка и синтез фантомов клеток меланомы.

Задачи работы:

1) Проведение анализа научной периодической литературы о меланогенезе, клетках меланомы, методах инкапсуляции нано- и микрочастиц и применении фотоакустической проточной цитометрии для диагностики различных заболеваний.

2) Разработка и синтез фантомов клеток меланомы, содержащих в своём составе меланин.

3) Визуальная оценка и сравнение клеток меланомы и их фантомов с использованием оптической микроскопии и спектроскопии КР.

4) Характеризация полученных фантомов клеток меланомы методами сканирующей электронной микроскопии, а также исследование их спектральных характеристик.

5) Исследование синтезированных фантомов с помощью метода фотоакустической проточной цитометрии.

Защищаемое положение: фантомы меланомных клеток, синтезированные на основе микрочастиц карбоната кальция и меланина, загруженного внутрь них методом индуцированной заморозкой адсорбции, в суспензии имеют спектр поглощения, на 94% схожий со спектром поглощения клеток меланомы B16-F10 в соответствии с оценкой методом косинусного сходства.

Дипломная работа занимает 50 страниц, имеет 17 рисунков и 1 таблицу.

Обзор составлен по 64 информационным источникам.

Работа содержит введение, четыре основных раздела: «Фантомы и требования к ним», «Тераностические объекты как основа фантомов», «Фотоакустическая проточная цитометрия» и «Создание и исследование фантомов меланомных клеток», заключение и список использованных источников.

Первый раздел представляет собой описание меланоцитов и клеток меланомы, а также структуры и свойств меланина, содержащегося в них. На основе этого выдвигаются требования к фантомам клеток меланомы.

Во втором разделе работы описываются особенности и преимущества использования микрочастиц карбоната кальция в качестве основы для формирования фантомов.

Третий раздел включает в себя описание метода фотоакустической проточной цитометрии, его принципа работы, особенностей, а также областей применения.

Четвёртый раздел представляет собой экспериментальную часть, посвященную созданию и исследованию фантомов меланомных клеток.

Основное содержание работы

Создание и исследование фантомов меланомных клеток. Циркулирующие в крови клетки меланомы пигментированы подобно меланоцитам, благодаря происходящему в них синтезу меланина, что облегчает их обнаружение *in vivo*. Для проведения различного вида исследований в качестве модели используют культуру клеток мышинной меланомы В16-F10. В прикрепленном виде клетки данной культуры имеют веретенообразную, вытянутую форму, однако, после открепления от тканей или какой-либо другой поверхности клетки попадают в кровоток, принимают сферическую форму и остаются такими до прикрепления где-либо в другом месте. Средний диаметр циркулирующих клеток В16-F10 составляет $13,4 \pm 4,3$ мкм.

Фантомы клеток меланомы, необходимые как для фотоакустической проточной цитометрии, так и для проверки и отработки других методов обнаружения раковых клеток, должны быть схожи с ними по размеру, морфологии, иметь схожие спектры поглощения и фотоакустический отклик. Для соответствия фантомов требуемым критериям они должны иметь размер не менее 10 мкм. Для создания подобных объектов подходят частицы карбоната кальция благодаря таким уникальным свойствам, как вариативность размера и формы, биосовместимость, а также возможность загрузки в пористую

структуру ватерита широкого спектра биологически активных веществ. Также полученные фантомы должны иметь спектр поглощения, характерный для меланина, содержащегося в раковых клетках.

Подобными спектрами поглощения обладают несколько веществ, из них: кофе, уголь, оксид железа (III) – магнетит. Однако, использование непосредственно меланина для создания фантомов клеток меланомы позволит получить наиболее адекватные и близкие по свойствам модели реальных раковых клеток.

Меланин. Для обеспечения наилучшего соответствия моделируемым объектам – клеткам меланомы мыши B16-F10 – при создании фантомов использовали меланин производства Sigma Aldrich (*Melanin from sepia officinalis*). Меланин является гидрофобным веществом, что приводит к его агрегации и, следовательно, невозможности дальнейшего использования для создания фантомов без дополнительной подготовки. Изображение исходной водной суспензии меланина, полученное на оптическом микроскопе Olympus, а также распределение размеров микрочастиц, рассчитанное на основе полученных изображений с помощью программы ImageJ, показано на рисунке 1. Из анализа диаграммы видно, что, несмотря на присутствие достаточно мелкой для загрузки в частицы ватерита фракции частиц с размером до 1 мкм, основная часть частиц меланина имеет размеры от 4 до 30 мкм.

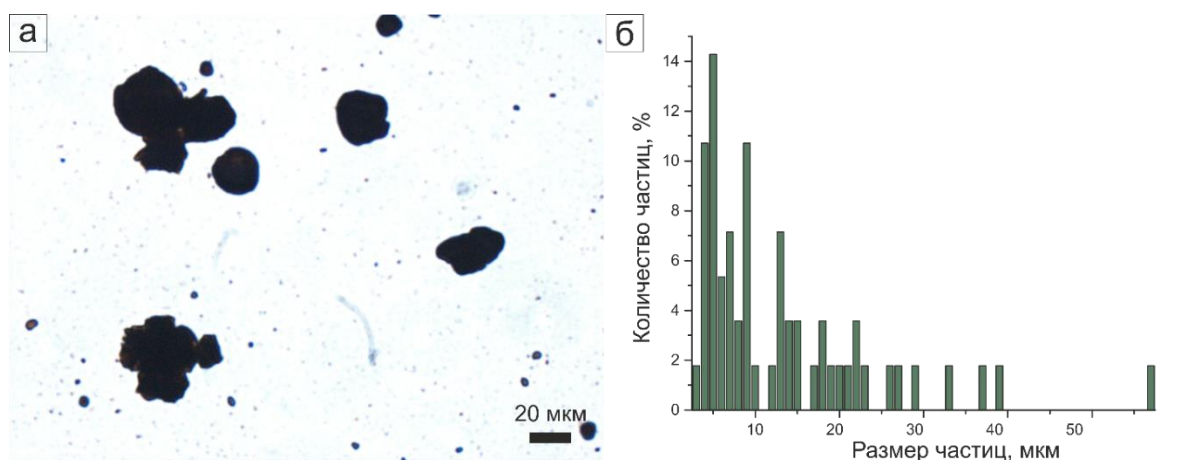


Рисунок 1 – (а) Изображение водной суспензии микрочастиц меланина, полученное на микроскопе Olympus и (б) диаграмма распределения размеров микрочастиц меланина

Таким образом, необходимо уменьшить размер частиц меланина до размеров, близких к размерам пор микрочастиц карбоната кальция. Для диспергирования меланина на более мелкие стабильные частицы было решено добавить к водной суспензии поверхностно-активное вещество – полиэлектролит поли(стиролсульфонат натрия) (ПСС) – с дальнейшей обработкой полученной суспензии ультразвуком.

Полученная водная суспензия меланина была исследована с использованием спектрофотометра Synergy H1. Были измерены спектры поглощения суспензии различной концентрации, на основе которых была построена калибровочная кривая для дальнейшего спектрофотометрического определения концентрации меланина в суспензии.

Синтез фантомов меланомы. Микрочастицы карбоната кальция, используемые в данной работе в качестве основы для формирования фантомов клеток меланомы, были получены методом химического соосаждения. Полученные микрочастицы карбоната кальция были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 2).

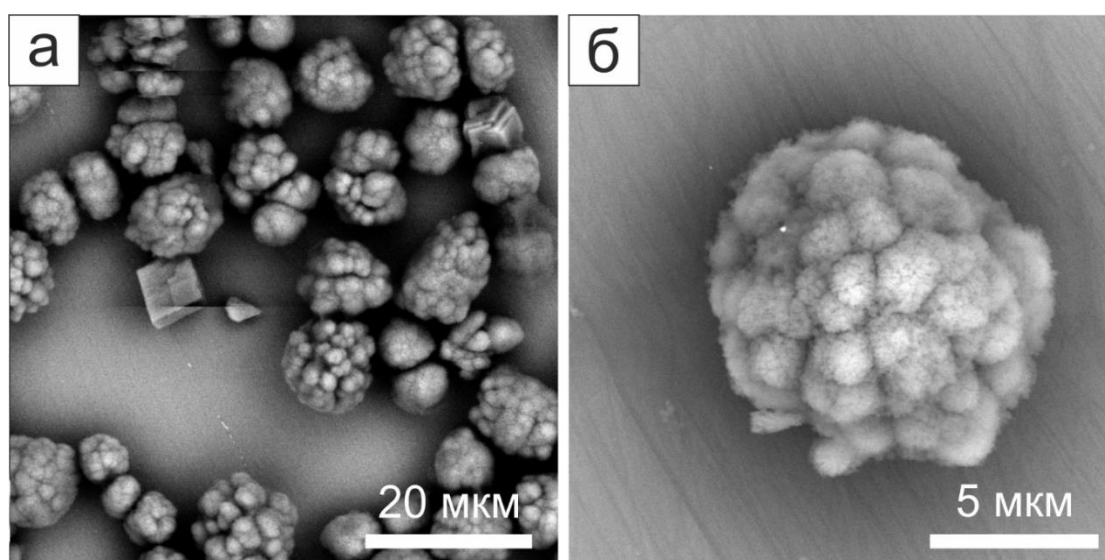


Рисунок 2 – Изображение микрочастиц карбоната кальция, полученное методом сканирующей электронной микроскопии

Чтобы получить загруженные меланином частицы карбоната кальция, их подвергли индуцированной заморозкой адсорбции в суспензии меланина. В результате после 4 загрузок содержание меланина в фантомах составило 7.59%

$\pm 0.19\%$ по массе или 759 ± 19 мкг/мл. Концентрацию измеряли спектрофотометрически по супернатанту после каждого цикла заморозки относительно построенной ранее калибровочной кривой.

Для стабилизации частиц и предотвращения их перекристаллизации, на полученные микрочастицы карбоната кальция, содержащие меланин, адсорбировали полимерную оболочку (ПАГ/ПСС)₂. Для предотвращения быстрой седиментации фантомов из-за их относительно большой массы карбонатную основу растворяли путём добавления к суспензии 0,2М этилендиаминтетраацетата натрия. Средний диаметр полученных фантомов составил 12 ± 3 мкм.

Исследование спектров поглощения полученных фантомов меланомы. Для оценки схожести оптических свойств на спектрофотометре был измерен спектр поглощения водной суспензии фантомов в концентрации 10 млн/мл. Во избежание влияния растворителя на конечный спектр, значение коэффициента поглощения для воды было вычтено из такового для фантомов на каждой измеряемой длине волны. То же самое было проделано и для суспензии клеток, ресуспензированных в аналогичной концентрации в фосфатном буфере (PBS). Однако, как известно, содержание меланина в клетках зависит от количества дней, на протяжении которых их культивировали, и, следовательно, интенсивность поглощения с течением времени также будет меняться. Чтобы избежать неточности в сравнении, спектры поглощения были измерены для клеток спустя 3 и 7 дней после начала культивирования. Как видно из рисунка 3, спектр фантомов близок по форме (наклону) к таковому для клеток V16-F10, а также соответствует по интенсивности спектру поглощения для клеток V16-F10 7-го дня культивирования.

Схожесть спектров поглощения суспензии фантомов и клеток мышинной меланомы оценивали методом косинусного сходства. Это мера сходства между двумя векторами предгильбертового пространства (линейное пространство с определённым на нём скалярным произведением), которая используется для

измерения косинуса угла между ними. Итоговое значение косинуса может варьироваться от 0 до 1, где значение «0» соответствует максимальному углу между векторами и, следовательно, минимальной схожести, а значение «1» характеризует абсолютное сходство векторов.

Для нахождения косинуса полученные спектры поглощения были представлены в виде n -мерных векторов, где n – число точек спектра. Значение косинуса было рассчитано по формуле (1).

$$\cos \alpha = \frac{a \cdot b}{|a| \cdot |b|}, \quad (1)$$

где a – вектор, соответствующий спектру поглощения фантомов;

b – вектор, соответствующий спектру поглощения клеток V16-F10;

$|a|$ – длина вектора a ;

$|b|$ – длина вектора b ;

α – угол между векторами.

В результате вычислений для косинуса было получено значение 0,994, близкое к единице, что свидетельствует о схожести исследуемых спектров поглощения.

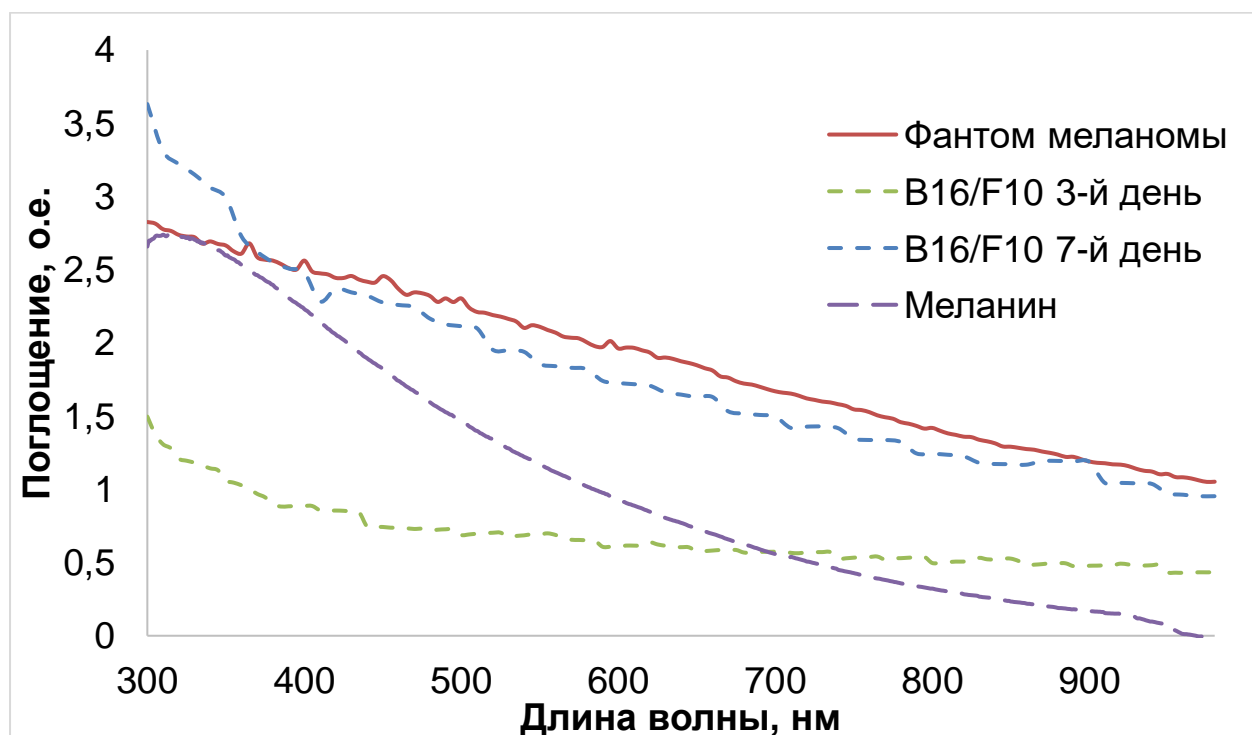


Рисунок 3 – Спектры поглощения водной суспензии фантомов и суспензий клеток меланомы V16-F10

При проведении фотоакустических измерений, кровь обеспечивает постоянный фотоакустический фоновый сигнал под воздействием лазера вследствие поглощения лазерной энергии гемоглобином, содержащимся в эритроцитах, а также благодаря большому числу объектов, одновременно находящихся в сечении капилляра. Циркулирующие меланомные клетки, содержащие меланин, имеют в несколько раз большее поглощение (по сравнению с фоном) на части спектра в видимом и в инфракрасном диапазоне. Однако, как правило, в сечении капилляра находится только несколько подобных клеток. Благодаря большому поглощению лазерного излучения такие клетки демонстрируют более интенсивный по амплитуде фотоакустический сигнал, явно видимый на графиках зависимости сигнала от времени (рисунок 4).

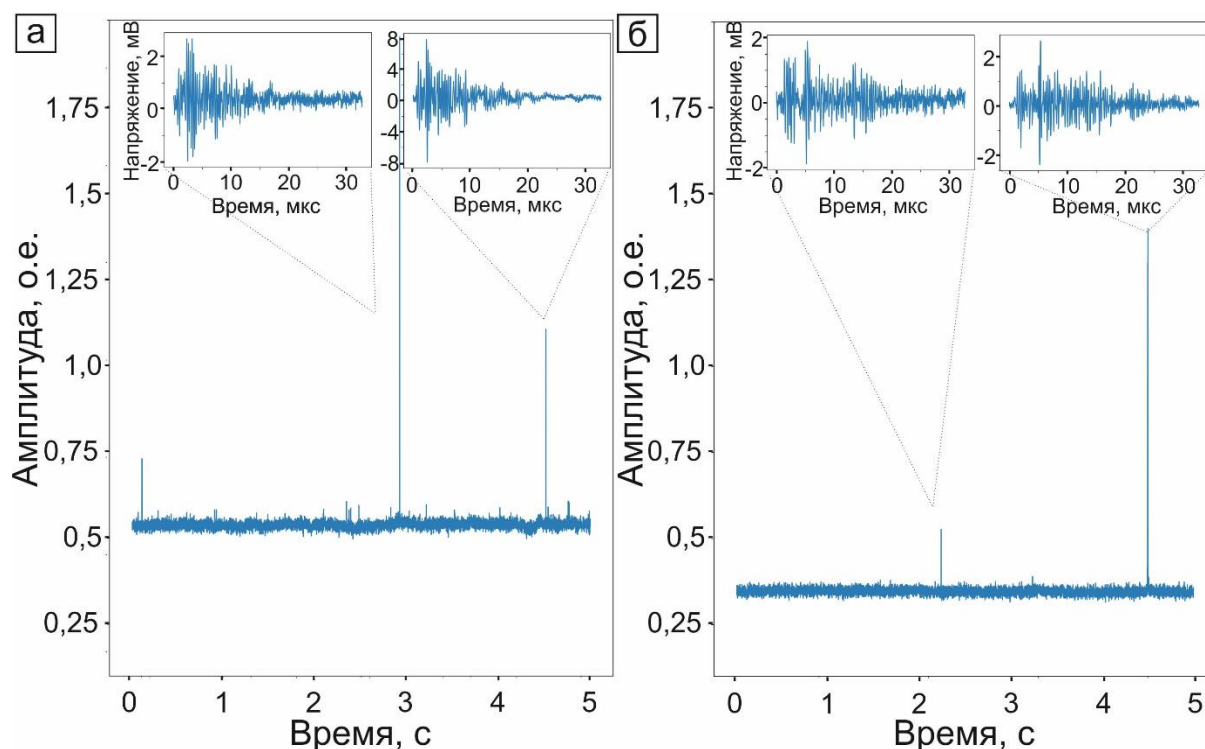


Рисунок 4 – Зависимости фотоакустического сигнала от времени для (а) крови человека, содержащей клетки В16-F10 и (б) крови человека, содержащей фантомы клеток меланомы, измеренные при энергии импульса лазера 100 мкДж. Во вставках представлены примеры полученных сигналов

Из графиков зависимостей сигнала от времени хорошо видны сигналы высокой амплитуды. Они соответствуют отдельным сильно поглощающим

объектам в исследуемой суспензии. Амплитуды фоновых сигналов между ними подчиняются закону о нормальном распределении и представляют собой общий фоновый сигнал, обусловленный в основном поглощением гемоглобина, содержащегося в эритроцитах, а также в некоторой степени поглощением стенок сосуда.

Однако, частота фотоакустических сигналов от клеток B16-F10 *in vivo* будет различной для разных людей, так как напрямую зависит от стадии заболевания и пигментации клеток. Поэтому такие сигналы, как правило, довольно редко встречаются на графиках и не могут обеспечить постоянный контроль. В то время как концентрацию фантомов клеток меланомы можно варьировать в широком диапазоне: от нескольких штук на мл до нескольких миллионов. Это даёт возможность использовать низкую концентрацию фантомов в образце для моделирования крови пациента, а высокую – для калибровки фотоакустической системы.

Заключение. Фантомы клеток меланомы необходимы для стандартизации и калибровки большого числа приборов и отработки методов ранней диагностики и лечения рака, наиболее перспективным из которых является метод фотоакустической проточной цитометрии.

Использование меланина – пигмента, изначально содержащегося в клетках меланомы – позволяет получить фантомы, наиболее адекватные и близкие по свойствам к аналогичным раковым клеткам. В ходе выполнения квалификационной работы были разработаны фантомы клеток меланомы, близкие к реальным объектам по форме, размеру, оптическим и фотоакустическим свойствам. Гетерогенность фантомов относительно содержания в них частиц меланина повторяет таковую для клеток меланомы B16-F10, являющихся модельными при исследованиях данного вида рака.

Ещё одна положительная особенность разработанных фантомов - возможность изменения их концентрации в суспензии. Таким образом, помимо схожести реологических и фотоакустических свойств, количество фантомов в образце

можно менять вручную в зависимости от заданных требований, контролируя частоту фотоакустических сигналов.

Кроме того, была показана возможность детектирования фантомов клеток меланомы методом спектроскопии КР, благодаря наличию в их спектре отчетливых характеристичных пиков, соответствующих меланину.

Таким образом, синтезированные и протестированные в рамках данной магистерской работы фантомы клеток меланомы повторяют морфологические, оптические и фотоакустические свойства реальных объектов, и, следовательно, могут быть использованы для калибровки различных проточных аналитических платформ.

Список использованных источников

- 1 Cai, C. In vivo photoacoustic flow cytometry for early malaria diagnosis / C. Cai K. A. Carey, D. A. Nedosekin, Y. A. Menyaev, M. Sarimollaoglu, E. I. Galanzha, J. S. Stumhofer, V. P. Zharov // *Cytom. Part A.* - 2016. - V. 89, № 6. - P. 531-542.
- 2 Galanzha, E. I. In vivo, Noninvasive, Label-Free Detection and Eradication of Circulating Metastatic Melanoma Cells Using Two-Color Photoacoustic Flow Cytometry with a Diode Laser / E. I. Galanzha, E. V. Shashkov, P. M. Spring, J. Y. Suen, V. P. Zharov // *Cancer Res.* - 2009. - V. 69, № 70. - P. 7926-7934.
- 3 Galanzha, E. I. Photoacoustic flow cytometry / E. I. Galanzha, V. P. Zharov // *Methods.* - 2012. - V. 57, № 3. - P. 280-296.
- 4 Wang, L. Photoacoustic Tomography: in Vivo Imaging From Organelles To Organs / L. Wang, S. Hu // *Science.* - 2012. - V. 335, № 6075. - P. 1458-1462.
- 5 Galanzha, E. I. In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells / E. I. Galanzha, E. V. Shashkov, T. Kelly, J. W. Kim, L. Yang, V. P. Zharov // *Nat. Nanotechnol.* - 2009. - V. 4, № 12. - P. 855-860.
- 6 O'Donnell, M. Can Molecular Imaging Enable Personalized

Diagnostics? An Example Using Magnetomotive Photoacoustic Imaging / M. O'Donnell, C. Wei, J. Xia, I. Pelivanov, C. Jia, S.-W. Huang, X. Hu, X. Gao // Ann. Biomed. Eng. - 2013. - V. 41, № 11. - P. 2237-2247.

7 Mallidi, S. Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance / S. Mallidi, G. P. Luke, S. Emelianov // Trends Biotechnol. - 2011. - V. 29, № 5. - P. 213-221.

8 Razansky, D. Multispectral opto-acoustic tomography of deep-seated fluorescent proteins in vivo / D. Razansky, M. Distel, C. Vinegoni, R. Ma, N. Perrimon, R. W. Köster, V. Ntziachristos // Nat. Photonics. - 2009. - V. 3, № 7. - P. 412-417.

9 Wang, J. Stem Cell Imaging: Tools to Improve Cell Delivery and Viability / J. Wang, J. V. Jokerst // Stem Cells Int. - 2016. - V. 2016. - P. 1-16.

10 Chakravarty, P. Delivery of molecules into cells using carbon nanoparticles activated by femtosecond laser pulses / P. Chakravarty, W. Qian, M. A. El-Sayed, M. R. Prausnitz // Nat. Nanotechnol. - 2010. - V. 5, № 8. - P. 607-611.