

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Исследование оптических и спектральных свойств хрящевой ткани при
оптическом просветлении**
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 4023 группы
направления (специальности) 03.03.02 Физика живых систем
Института физики
Лещева Вячеслава Константиновича

Научный руководитель
член-корреспондент РАН,
д.ф.-м.н., профессор



В. В. Тучин

Зав. кафедрой оптики и
биофотоники,
член-корреспондент РАН,
д.ф.-м.н., профессор



В. В. Тучин

Саратов 2022 год

ВВЕДЕНИЕ

В дипломной работе будут рассмотрены различные механизмы оптического просветления биоткани, а также различные просветляющие агенты и оптические и спектральные свойства биологической ткани при просветлении. Будут сделаны выводы об эффективности просветления тем или иным просветляющим агентом.

Оптические методы исследования широко используются во всех отраслях современной медицины, таких как офтальмология, дерматология и др. Оптические методы используются для наблюдения за активностью мозга, сердца, функциональной активности сосудистой системы, определения скорости кровотока и лимфотока, объема крови в биологических тканях и степени их оксигенации. Одной из основных проблем при применении оптических методов является сложный характер взаимодействия оптического излучения с биологической тканью. Их сложная природа обусловлена их оптической неравномерностью, что приводит к сильному рассеянию светового излучения в видимом и ближнем инфракрасном спектрах. Контроль оптических параметров биотканей – это новое направление оптики биотканей, основанное на изменении поглощающих и рассеивающих свойств биотканей под воздействием различных физических и химических факторов, таких как сжатие, растяжение, обезвоживание, температурное воздействие и пропитка различными растворами, основанное на методе сравнения показателя преломления компонентов биологических тканей под воздействием раствора, называется иммерсионным оптическим просветлением биологических тканей.

В настоящее время изучаются и тестируются методы оптического просветления биологических образцов в связи с необходимостью увеличения глубины зондирования биоткани излучением видимого и ближнего инфракрасного спектра, а также повышения контрастности изображений биологических образцов. Дальнейшие исследования в этой области расширят круг задач за счет неинвазивных методов диагностики и лечения определенных заболеваний. По сравнению с инвазивными методами, неинвазивные методы имеют много преимуществ, таких как: безопасность, снижение нагрузки на пациента, они не мешают естественным процессам организма.

Значительный прогресс в разработке неинвазивных методов многофункциональных клинических исследований различных заболеваний во многом обусловлен разработкой методов оптической диагностики. В дерматологии, гинекологии, гастроэнтерологии перспективны оптические

методы диагностики, локализации и лечения опухолей фотодинамической терапии различных заболеваний, маммографии и томографии кожи и внутренних органов. В офтальмологии при лечении глаукомы, отслойки сетчатки и ряда других заболеваний широко используется трансклеральная фотокоагуляция тканей глазного яблока - цилиарного тела, сетчатки и др. Данные способы используются для мониторинга функциональной активности головного мозга, сердечной деятельности, работы сосудистой системы, определения скорости кровотока и лимфотока, объема крови в биологических тканях и степени ее оксигенации.

Одна из основных проблем использования оптических методов в медицине связана со сложным характером переноса оптического излучения - его значительным перераспределением по угловым координатам и значительным ослаблением коллимированных пучков при прохождении через поверхностные слои биологических тканей, примерами которых являются кожа, склеры глаз, твердой мозговой оболочки и т. д. Сложный характер взаимодействия оптического излучения с биологическими тканями обусловлен их оптической неоднородностью, которая вызывает сильное рассеяние излучения в видимом и ближнем инфракрасном спектральных диапазонах, что значительно ограничивает пространственное разрешение и глубину обнаружения многих оптических методов. Но есть решение проблемы.

Управление оптическими параметрами биологических тканей – это довольно новый раздел оптики биологических тканей, основанный на изменении характеристик поглощения и диффузии биологических тканей под влиянием различных физико-химических факторов, таких как сжатие, растяжение, дегидратация, коагуляция, охлаждение биологических тканей, а также воздействие на биологические ткани различными химическими растворами, гелями и маслами. В настоящее время этот метод, основанный на изменении показателей преломления структурных компонентов биологических тканей и окружающего их вещества, стал наиболее широко используемым под названием "оптическое просветление биологических тканей" (в английской литературе - tissue optical clearing). Временное селективное просветление верхних слоев биологических тканей является ключевым моментом в разработке метода структурного и функционального зондирования биологических тканей, используемого, в частности, для обнаружения статических и динамических макрогенераций, скрытых в высоко диффундирующих средах, которыми являются биологические ткани.

Целью данной работы является рассмотрение оптических и спектральных свойства хрящевой ткани при оптическом просветлении с помощью иммерсионной жидкости – раствора глицерина и пропиленгликоля, раствора

глицерина и ДМСО. Проведение сравнения эффективности различных просветляющих агентов, подведение итогов, анализ полученных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Управление оптическими свойствами биологических тканей - раздел оптики биотканей, основанный на изменении поглощающих и рассеивающих параметров биотканей под действием различных внешних факторов, например, сжатия, растяжения, дегидратации, коагуляции, охлаждения биотканей, а также пропитывании биологических тканей различными химическими растворами. В данной работе будет рассмотрен метод, основанный на выравнивании показателей преломления структурных компонент биологических тканей и межклеточного пространства с помощью просветляющего агента, называемый «оптическое просветление биотканей» (в англ. источниках - tissue optical clearing). Временное просветление верхних слоев биологических тканей является ключевым моментом развития оптических методов исследования и диагностики макронеоднородностей скрытых в сильно рассеивающих средах, к которым относятся биологические ткани. Мотивацией для исследования и использования оптического просветления биотканей является необходимость увеличения достаточно малой глубины исследования биотканей с помощью оптических методов, а также повышение пространственного разрешения и контраста изображений структурных компонент биотканей при использовании оптической томографии [1].

Рассеяние и поглощение.

Биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами, средний показатель преломления которых выше, чем у воздуха. За счет этого часть падающего излучения отражается на границе между биотканью и воздухом (френелевское отражение), а оставшаяся часть проникает в глубь биоткани. Многократное рассеяние и поглощение отвечают за расширение лазерного пучка и его ослабление по мере распространения в биоткани, в то время как объемное рассеяние является основной причиной возникновения значительной диффузной составляющей излучения в обратном направлении. Распространение света в биоткани зависит от рассеивающих и поглощающих свойств ее компонентов: клеток, клеточных органелл и разнообразных волокнистых (фиброзных) структур. Размеры, форма и плотность этих структур, их показатель преломления по отношению к окружающему веществу, поляризация падающего света — все это играет важную роль в распространении света через биоткани [2].

Общие сведения об ОПА

Сильно рассеивающие свойства, наблюдаемые в биологических тканях, в значительной степени обусловлены неоднородностью распределения показателя преломления, другими словами, несоответствием между показателями преломления различных компонентов биологической ткани и межклеточными жидкостями. Большое содержание воды в тканевых жидкостях является основной причиной этого эффекта, поскольку показатель преломления воды низок по сравнению с показателем преломления, наблюдаемым для других компонентов ткани, таких как коллагеновые волокна, липидные глобулы, клеточные органеллы и т.д. Замена воды в тканевых жидкостях безвредной жидкостью, обладающей более высоким показателем преломления, который будет ближе к показателю преломления структурных компонентов ткани, позволяет уменьшить несоответствие показателя преломления и сделать ткани прозрачными.

Исследования, связанные с оптическим просветлением (ОП), быстро развивались в последние два десятилетия, где были проведены исследования для оценки эффективности различных агентов в различных тканях. 3.2. Виды ОПА

Оптические просветляющие агенты (ОПА) для применения *in vivo* являются безвредными химическими веществами, и наиболее распространенные из них подразделяются на три класса: сахара, спирты и контрастные растворы электролитов.

Сахара, (глюкоза, фруктоза...) в обычном состоянии находятся в твердой форме в виде порошка после рафинирования, но они растворимы в воде и других жидкостях. Они находят различное применение в пищевой промышленности в качестве подсластителей, а также могут быть использованы в медицине.

Спирты, (сорбит, глицерин и пропиленгликоль...), используются в пищевой промышленности, косметике или медицине и являются очень эффективными ОПА благодаря высокому показателю преломления, сопоставимому с показателем преломления биоткани, и высокой растворимости в воде, что позволяет готовить растворы с высокой осмолярностью. СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ. ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние света (SERS) или гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) - это сверхчувствительный метод колебательной спектроскопии, служащий для обнаружения малых концентраций молекул на поверхности или вблизи поверхности плазмонных

наноструктур, значительно расширяющий роль стандартной КР спектроскопии. С момента своего открытия в 1970-х годах SERS применялся для многих анализов, особенно в биохимии и науках о жизни. Классическим применением является прямое зондирование различных анализируемых веществ, прикрепленных к металлической структуре SERS, что позволяет получать как качественную, так и количественную информацию на основе спектров SERS анализируемых веществ.

Совсем недавно этот метод был использован для создания новых нанозондов, названных “SERS-метками”, которые объединяют металлические наночастицы (NPs) и специфические органические молекулы-репортеры комбинационного рассеяния света. Такие SERS-активные нанозонды генерируют сильные, характерные сигналы КР и могут использоваться для косвенного обнаружения молекул-мишеней с помощью лазерной КР спектроскопии или SERS-микроскопии, демонстрируя функции оптического мечения, аналогичные функциям внешних хромофоров, таких как органические красители и флуоресцентные квантовые точки. Однако этот тип зонда обладает сверхчувствительностью, мультиплексированием и количественными возможностями метода SERS, и он демонстрирует экстраординарные возможности для биоанализа [3].

Оптическое просветление межпозвоночного диска коровы

Целью данного эксперимента является просветление биоткани и вычисление контраста. Процесс оптического просветления будет фиксироваться через определенные временные интервалы на неподвижно закрепленную фотокамеру. Полученные результаты, то есть фотографии будут обработаны с помощью графического редактора «Paint».

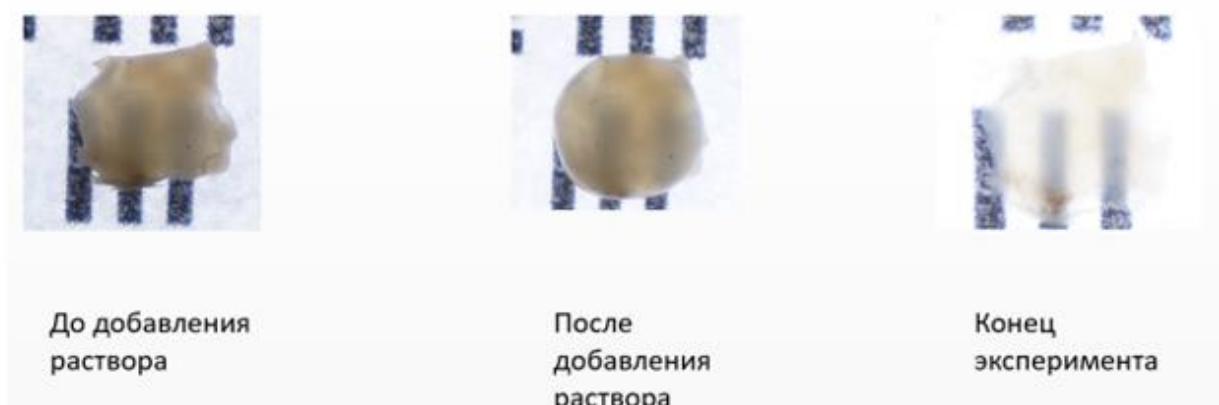


Рис. 1. Пример оптического просветления

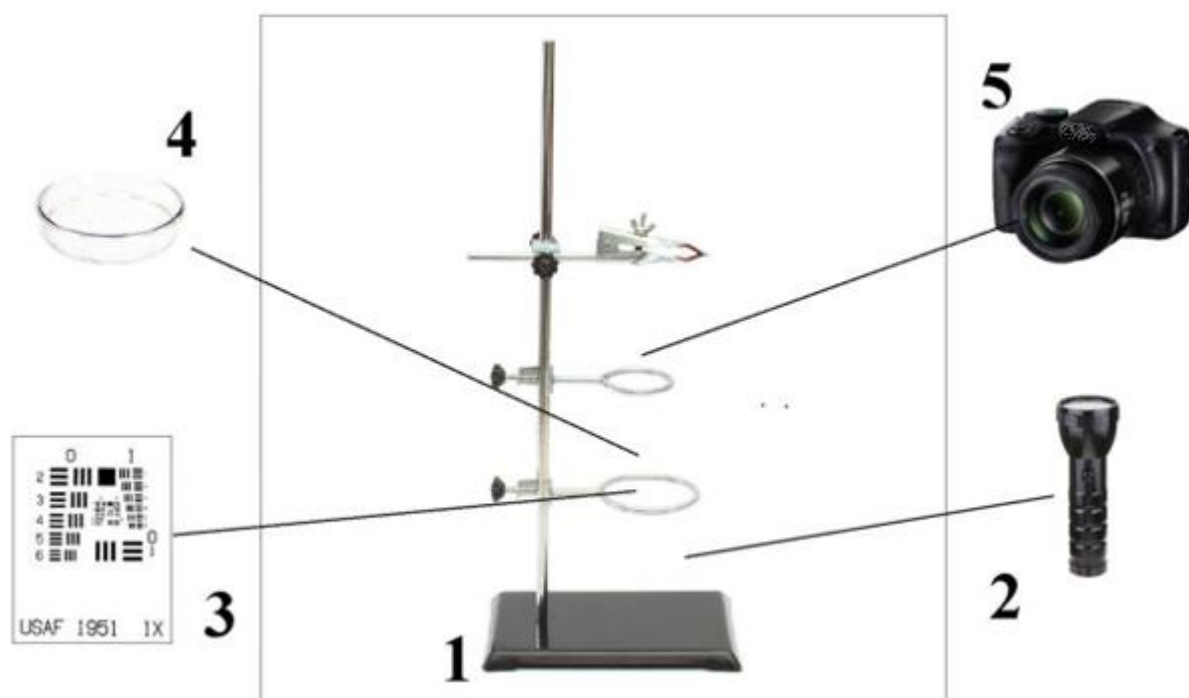


Рис. 2. Экспериментальная установка, 1 – лабораторный штатив, 2 – фонарик (1 светодиод, световой поток 50 лм), 3 – USAF 1951 resolution test chart, 4 – чашка Петри, 5 – фотокамера.

Проведение эксперимента

Была проведена серия экспериментов по просветлению биологической ткани – межпозвоночного диска коровы. В чашку Петри помещался подготовленный и измеренный микрометром, и взвешенный на электронных весах образец хрящевой ткани, настраивался фокус у фотокамеры, добавлялось 50 мкл просветляющего агента на образец, который не должен всплыть, так как в данном эксперименте подразумевается, что диффузия иммерсионной жидкости происходит только с одной стороны. После добавления агента делается первая фотография, которая будет использоваться как нулевое значение. Далее, фотографии делаются в определенное время: 30 секунд, 1 минута, 2 минуты, 4 минуты..., 30 минут. После эксперимента проводился замер толщины образца. Данные по толщинам образцов в таблице 1. Полученные фотографии обрабатывались с помощью программы «Paint», измерялась яркость пикселя в ROI. По полученным результатам был построен график зависимости яркости пикселя от времени, усредненный по всем экспериментам рисунок 2.

Ном	1	2	3	4	5	6	7	8
-----	---	---	---	---	---	---	---	---

ер образца								
Масс а до, г	0 ,065	0, 070	0, 074	0, 081	0, 072	0, 079	0 ,078	0 ,069
Масс а после, г	0 ,067	0, 072	0, 085	0, 092	0, 077	0, 083	0 ,086	0 ,072
Тол щина до, мм	0 ,714	0, 696	0, 779	0, 713	0, 700	0, 811	0 ,785	0 ,658
Тол щина после, мм	0 ,811	0, 822	0, 856	0, 922	0, 856	0, 870	0 ,902	0 ,790

Таблица 1. Экспериментальные данные

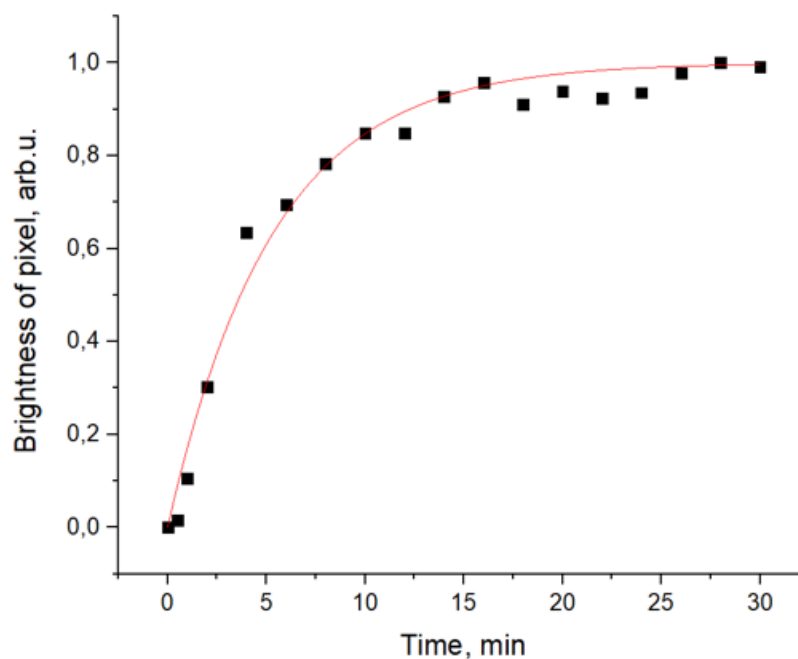


Рис. 3. Усредненный по всем экспериментам график зависимости яркости пикселя от времени. Красная линия – кривая аппроксимации по формуле: $T_c = 1 - \exp(-\frac{t}{\tau})$

Далее, считался контраст – отношение яркости в светлой ROI к яркости в темной ROI, пример таких ROI показан на рисунке 5. Для вычисления значения контраста применялась формула (1)

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

где K – значение контраста, I_{max} – значение яркости в светлой зоне, I_{min} – значение яркости в темной зоне [4].

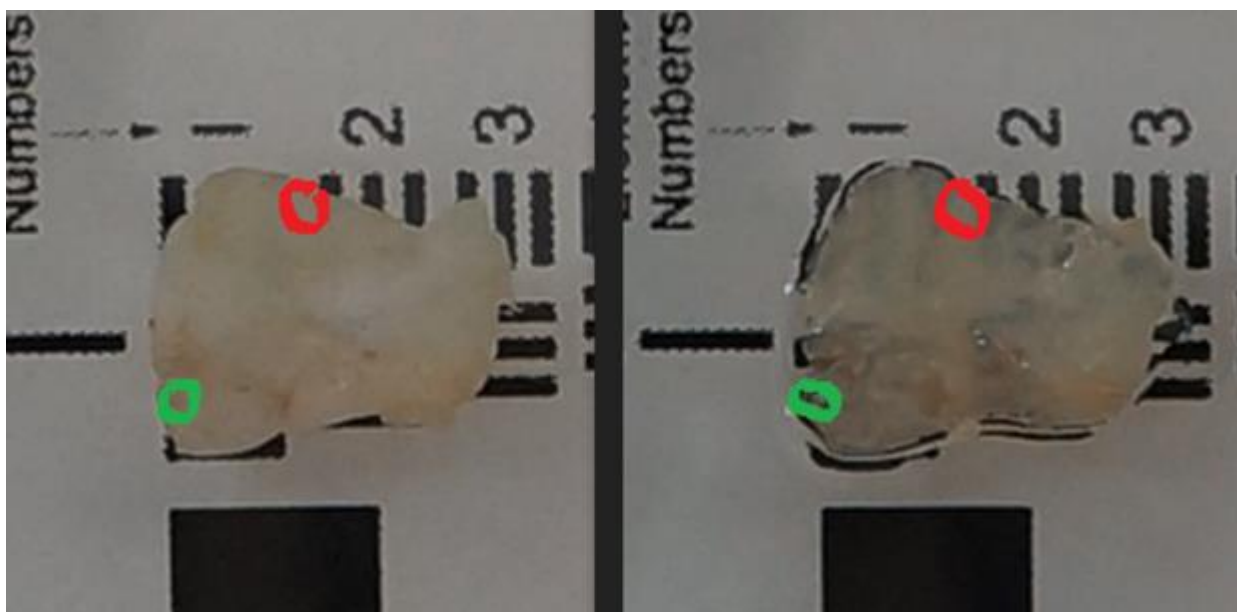


Рис. 4 Образец, слева – начальный момент времени, справа – через 30 минут, на рисунке указаны ROI светлого участка биоткани и темного для данного образца, по которым считался контраст.

Изменение контраста изображения в среднем составило $\Delta K = 0,183 \pm 0,09$.

Полученные данные были нормированы и проведена аппроксимация по формуле ($T_c = 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$), и на основе полученных данных было подобрано значение для $\tau = 6,244 \pm 0,26$. Далее, используя полученные данные, считался коэффициент диффузии просветляющего агента.

$$D = 5,31 * 10^{-6} \frac{\text{см}^2}{\text{с}}$$

Измерение пика интенсивности комбинационного рассеяния (КР) золотых наностержней. Анализ влияния оптического просветления биоткани на пик интенсивности рамановского излучения.

Целью данного эксперимента является ознакомление с спектроскопией комбинационного рассеяния. С помощью спектрометра КР будет определен пик интенсивности золотых наночастиц в форме стержней (англ. –nanorods,

сокр. – NR), находящихся в агарозном геле, что является фантомом биологической ткани. Следующий этап – замер интенсивности рамановского излучения (комбинационного рассеяния) при прохождении через биоткань (хрящ), которая будет находиться на поверхности агарозного геля. После этого хрящевая ткань будет оптически просветлена с помощью различных иммерсионных жидкостей (глицерин пропиленгликоль и глицерин ДМСО), и повторно будет измерен пик интенсивности. Ожидается, что после оптического просветления пик интенсивности излучения КР золотых наночастиц вырастет в разы относительно непросветленной биоткани.

Измерение значений интенсивности КР фантома биоткани

Используя Рамановский спектрометр были проведены измерения интенсивности комбинационного рассеяния золотых фантома биоткани с золотыми наностержнями. На рисунке 5 показан пик интенсивности рамановского излучения фантома биоткани.

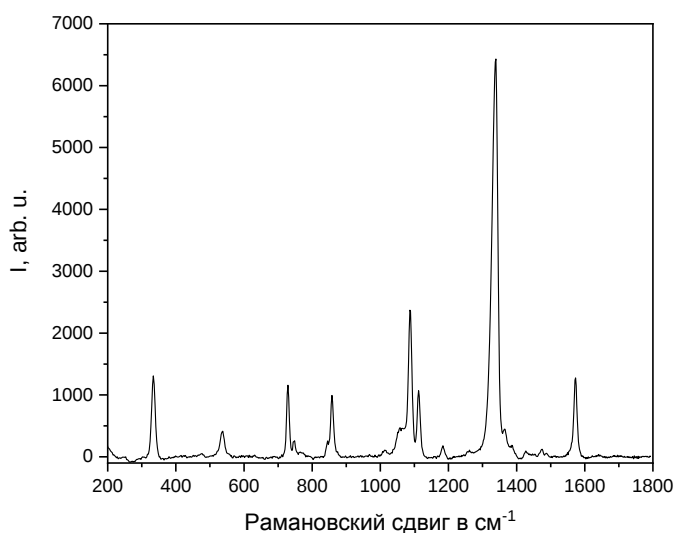


Рис. 5. Агарозный гель с золотыми наностержнями (Пик на 1330 см^{-1} равен 6449 arb. u.)

3. Измерение значений интенсивности рамановского излучения фантома биоткани с исследуемым образцом

В чашку Петри с агарозным гелем с наночастицами поместили непросветленный подготовленный слайс хрящевой ткани. Измерили интенсивность комбинационного рассеяния рисунок 6.

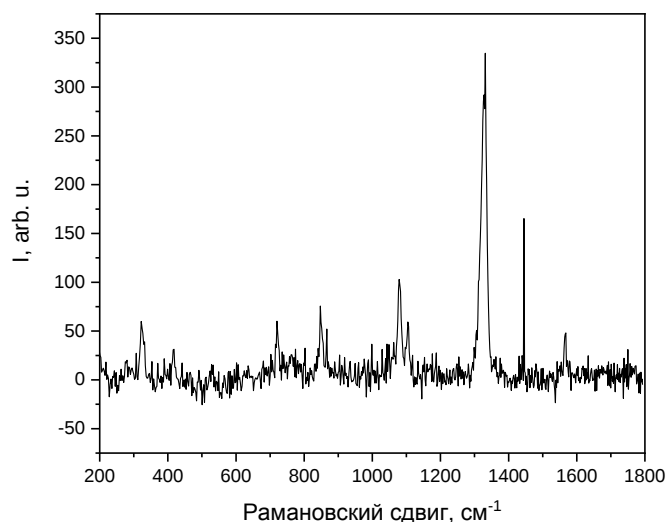


Рис. 6. Агарозный гель с непросветленным образцом (Пик на 1330 см^{-1} равен 334 arb. u.)

Как видно на рисунке 6, интенсивность рамановского излучения сильно упала. Это связано с тем, что излучение проходит через сильно поглощающую биоткань.

Следующим шагом будет попытка уменьшить рассеяние биологической ткани с помощью метода оптического просветления. Выше описанные действия по измерению интенсивности КР были повторены с оптически просветленными слайсами биоткани различными ОПА. Результаты показаны на рисунках 7 и 8.

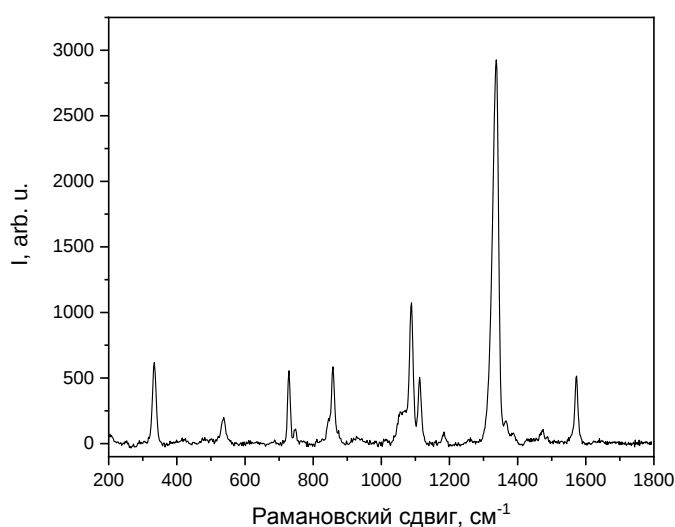


Рис. 7. Агарозный гель с просветленным образцом 1 (VG/PG) (Пик на 1330 см^{-1} равен 2926 arb. u.)

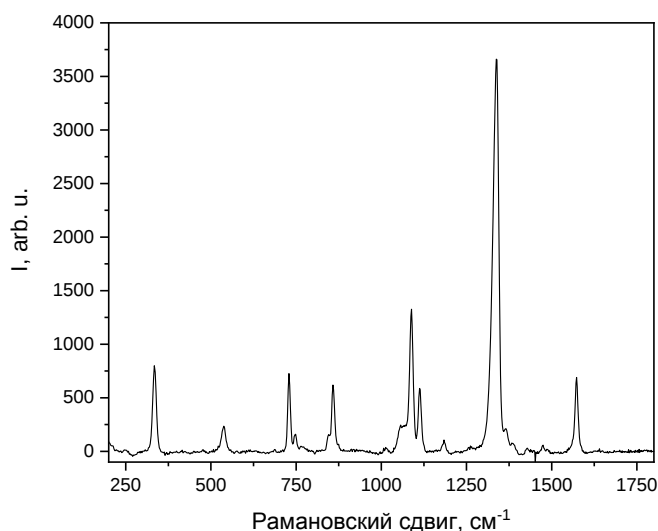


Рис. 8. Агарозный гель с просветленным образцом 3 (VG/DMSO) (Пик на 1330 см^{-1} 3682 arb. U.)

Как видно из полученных данных с рисунков 7 и 8, просветляющий агент глицерин DMSO оказался эффективнее, чем раствор глицерина пропиленгликоля.

Выводы

В ходе выполнения данной работы были получены следующие значения. Изменение контраста изображения в среднем составило $\Delta K = 0,183 \pm 0,11$. Экспериментально было подобрано значение для $\tau = 6,24 \pm 0,26$ мин. С помощью значения τ был вычислен считался коэффициент диффузии просветляющего агента D_a , равный $5,31 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Проведен эксперимент на спектрометре КР по измерению спектров комбинационного рассеяния золотых наностержней. Проведено сравнение эффективности различных ОПА. Увеличение интенсивности составило 8,9 раз для VG/PG и 11,2 раза для VG/DMSO. Как видно из полученных результатов, просветляющий агент, состоящий из VG/DMSO 70/30 является более эффективным, по сравнению с VG/PG 70/30, хотя значения не сильно отличаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление биологических тканей: перспективы применения в медицинской диагностике и фототерапии // Альманах клинической медицины. 2008. № 17-1. С. 39–42.
2. Г.В. Симоненко, В.В. Тучин. Оптический практикум по физике живых систем// Оптический практикум.
3. SERS Tags: Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis Yunqing Wang, Bing Yan, and Lingxin Chen,
4. D. K. Tuchina, I. G. Meerovich, O. A. Sindeeva ,V. V. Zherdeva, A. P. Savitsky, A. A. Bogdanov, V. V. Tuchin Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging