

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

Кафедра оптики и биофотоники

**Оптическая визуализация биопсийных образцов хрящевой ткани с
использованием ОКТ и смартфона при оптическом просветлении**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 4023 группы
направления (специальности) 03.03.02 Физика
Института физики
Елизарова Арсения Данииловича

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 настоящее время оптические методы исследования играют важную роль в современной медицине. В медицинской диагностике активно применяются такие методы, как оптическая когерентная томография (ОКТ), флуоресцентная спектроскопия, конфокальная микроскопия, оптическая диффузионная томография. Также все чаще применяются методы лазерной терапии и хирургии, в частности, в офтальмологии [1]. Биологические ткани представляют собой оптически неоднородные поглощающие среды, средний показатель преломления которых выше, чем у воздуха [2]. Благодаря этому часть падающего излучения отражается на границе между биологической тканью и воздухом, а оставшаяся часть проникает глубоко в биологическую ткань. Многократное преломление светового потока внутри биологической ткани, из-за большого количества границ раздела внутренних компонентов (клеток, клеточных органелл и различных волокнистых (волокнистых) структур) приводит к многократному рассеянию света, проходящего через ткань. Размер, форма и плотность этих структур, их показатель преломления относительно окружающей среды, поляризация падающего света — все это играет важную роль в распространении света через биологические ткани.

Биологические ткани состоят из плотно упакованных групп клеток, заключенных в сеть волокон, через которые просачивается интерстициальная жидкость. В микроскопическом масштабе компоненты ткани не имеют ярко выраженных границ, поэтому ткань можно рассматривать как непрерывную структуру с пространственными изменениями показателя преломления. Тканевыми компонентами, которые вносят наибольший вклад в локальные изменения показателя преломления, являются волокна соединительной ткани (коллаген, эластин, ретикулярные волокна), которые образуют часть неклеточного тканевого матрикса вокруг и между клетками, а также клеточные мембраны; цитоплазматические органеллы (митохондрии, лизосомы, пероксисомы и ядра клеток) и гранулы меланина [3].

Целью дипломной работы является исследование эффективности некоторых методов оптической визуализации образцов биоткани при оптическом просветлении.

Для реализации цели были решены следующие задачи:

- подготовка ОПА, состоящего из 70% глицерина и 30% пропиленгликоля
- подготовка срезов образцов ткани (хрящевая ткань коровы)
- проведение экспериментов по визуализации оптического просветления методами ГКР, ОКТ и визуализации при помощи смартфона
- обработка экспериментальных данных

Основное содержание работы. Повысить глубину зондирования и повысить контраст оптических изображений можно, используя различные технологии управления оптическими свойствами биотканей. В работах [4-7] было показано, что оптическими свойствами биоткани можно эффективно управлять, например, с помощью биологически совместимых гиперосмотических растворов. Основным механизмом в данном методе является согласование показателей преломления компонентов ткани и межклеточной жидкости. Гиперосмотический раствор диффундирует внутрь ткани и вытесняет воду из межклеточного пространства, что обеспечивает согласование показателей преломления внутритканевой жидкости и рассеивателей, уменьшение рассеяния ткани и, как следствие, ее оптическое просветление.

Определение показателя преломления ОПА

В ходе проделанной работы был измерен показатель преломления ОПА на разных длинах волн и получена его зависимость от длины волны.

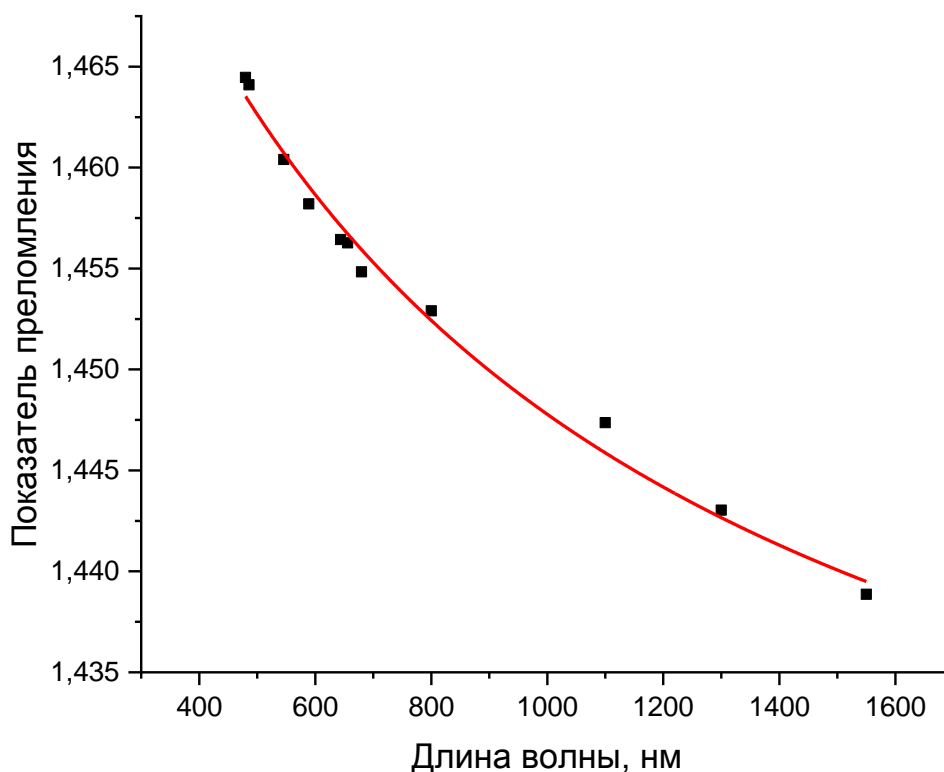


Рисунок 1 - График зависимости показателя преломления ОПА от длины волны.

На основе полученных данных была получена зависимость показателя преломления ОПА от длины волны:

$$1,416 + \frac{50,7}{\lambda + 579,6} \quad (1)$$

Аппроксимация производилась по формуле

$$1,416 + \frac{A}{\lambda + B} \quad (2)$$

Визуализация оптического просветления при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния

Для данного исследования были изготовлены фантомы биоткани, состоящие из агарозного геля с добавлением суспензии наночастиц золота в форме звёзд. Затем производились измерения ГКР спектров наночастиц в агарозном геле в диапазоне сдвигов частоты 200-2000 см⁻¹ при помощи КР

спектрометра. Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 2

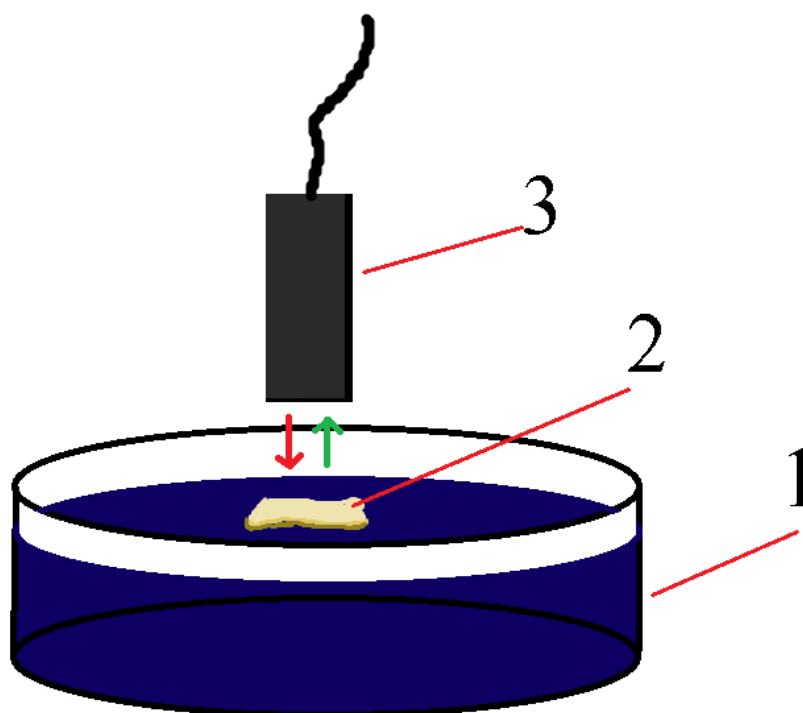


Рисунок 2 - Схема экспериментальной установки: 1) чашка Петри с фантомом биоткани; 2) образец биоткани; 3) источник и детектор спектрометра.

Таблица 1 - Полученные значения интенсивности ГКР спектра для каждого образца на частоте 1330 см^{-1} .

| № | Амплитуда ГКР пика “нанозвезд” |
|---------------------------|--------------------------------|
| 1 просветленный образец | 521 ед. |
| 2 непросветленный образец | 83 ед. |
| 3 просветленный образец | 1069 ед. |
| 4 непросветленный образец | 181 ед. |

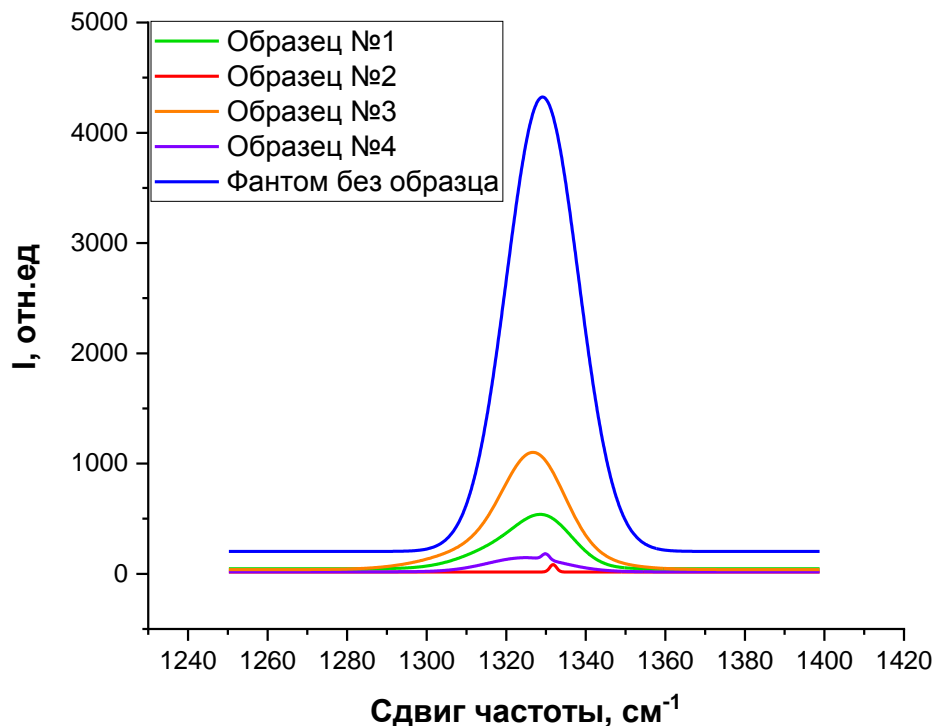


Рисунок 4 - ГРП спектры фантома биоткани вблизи частоты 1330 см^{-1} , без образца хряща, с непросветленными (№№ 2 и 4) и просветленными образцами (№№ 1 и 3).

Коэффициент увеличения составил для образца, просветленного ОПА, состоящего из 70% глицерина (VG) и 30% диметилсульфоксида (ДМСО), составил $\frac{521}{81} = 6.4$, а для образца, просветленного ОПА, состоящего из 70% глицерина (VG) и 30% пропиленгликоля (PG)- $\frac{1069}{181} = 5.9$. Вторым ОПА был взят в качестве контрольного, т.к. в данном эксперименте были выбраны относительно толстые срезы хрящевой ткани, а ДМСО является более сильным усилителем проницаемости.

Визуализация образцов биоткани с помощью смартфона

Для данного исследования была произведена серия экспериментов с тонкими срезами межпозвоночной хрящевой ткани коровы. Экспериментальная установка (рисунок 12) состояла из лабораторного штатива, в верхней части которого закреплен смартфон с камерой, для фиксации результатов в ходе эксперимента в нижней части штатива располагается чашка Петри с образцом ткани и иммерсионным агентом. Под чашкой Петри находится 1951 USAF resolution test chart для измерения контраста полученных изображений и источник света.

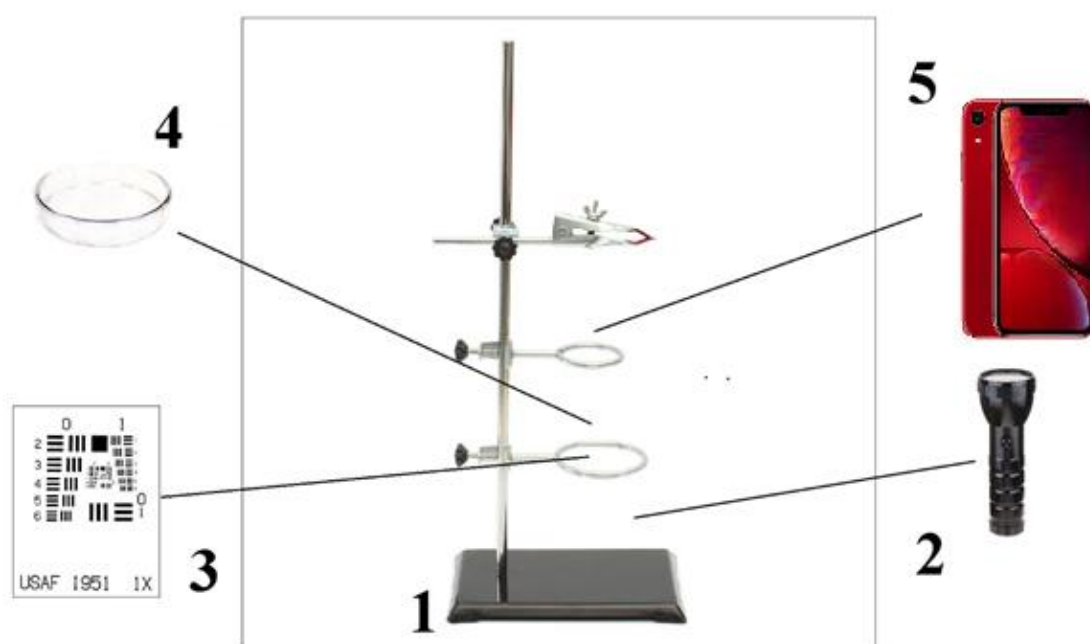


Рисунок 5 - Схематичное изображение экспериментальной установки: 1- лабораторный штатив; 2- источник света; 3- USAF 1951 resolution test chart; 4- чашка Петри; 5- смартфон с камерой.

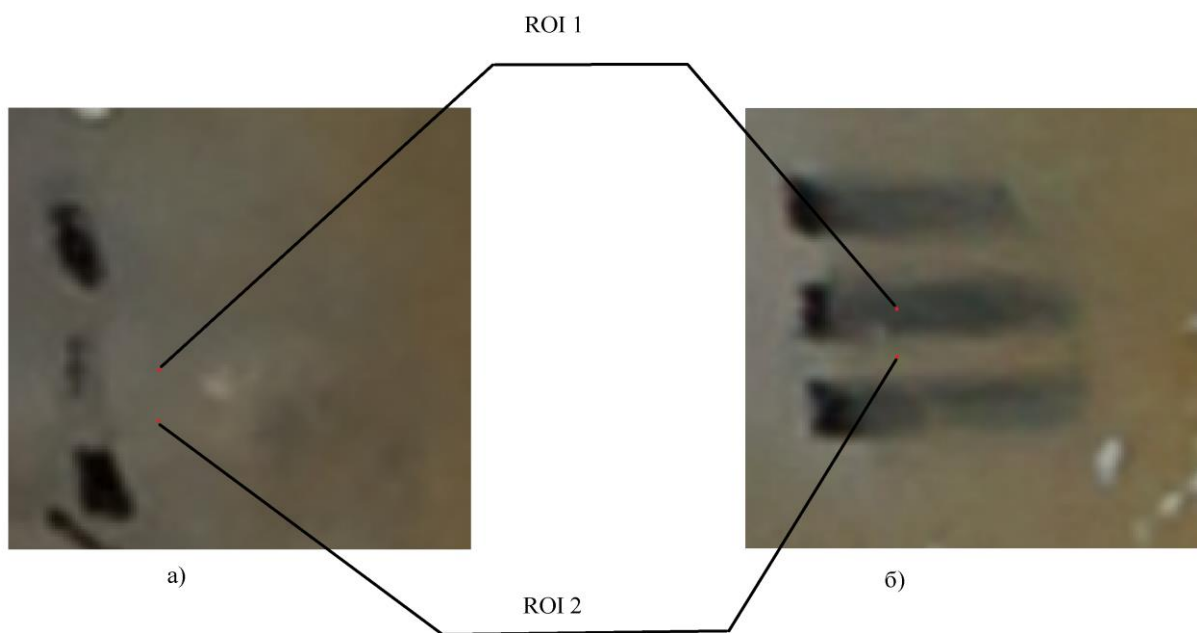


Рисунок 6 - Изображения образца биоткани-хряща: а) до оптического просветления; б) после 30 минут оптического просветления

Для каждого образца проводились измерения толщины и площади до начала воздействия ОПА и после 30 мин. воздействия.

Таблица 2 - Усреднённые значения объема образцов

| | Объем образца, мм ³ |
|-----------------------|--------------------------------|
| До воздействия ОПА | 18,9 |
| После воздействия ОПА | 17,9 |
| Разность объемов | 1 |

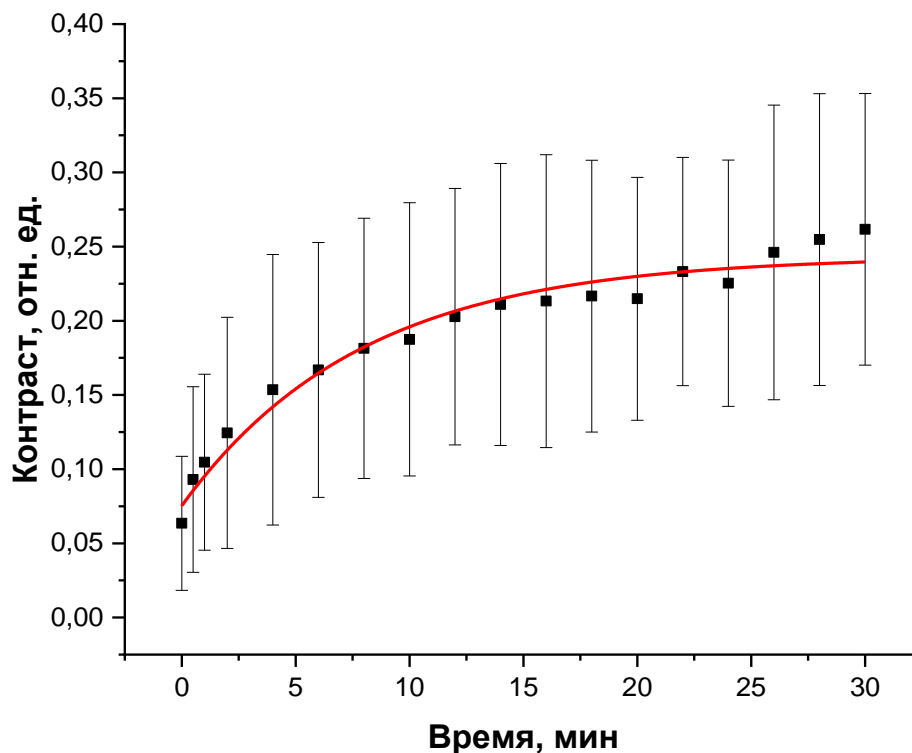


Рисунок 7 - Нормированный на максимальную яркость график зависимости контраста между ROI1 и ROI 2 (рис. 12), усредненной по 13 образцам, от времени.

Контраст считался по формуле:

$$K = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (4),$$

где K-значение контраста, I_{max} - значение яркости в светлой зоне, I_{min} - значение яркости в темной зоне.

Среднее значение контраста в начальный момент времени (0мин) $K_0 = 0,06$

Среднее значение контраста после просветления (30 мин) $K_1 = 0,26$

Изменение контраста изображения в среднем составило $\Delta K = 0,20 \pm 0,08$

Расчет коэффициента пористости исследуемой ткани:

Тканевая жидкость составляет около 70% объема невысушенного хряща, остальной объем ткани приходится в основном на коллагеновые волокна, объем которых не изменяется при взаимодействии с ОПА, коэффициент пористости вычислялся по формуле:

$$p = \frac{V - V_c}{V} \quad , \quad (5)$$

где V -объем образца ткани, V_c - объем коллагеновых волокон в образце.

Пористость ткани до воздействия ОПА составила: $p_0 = 0,70$; после- $p_1 = 0,68$

Разность пористости ткани составила $\Delta p = 0,70 - 0,68 = 0,02$.

Расчет коэффициентов диффузии и проницаемости

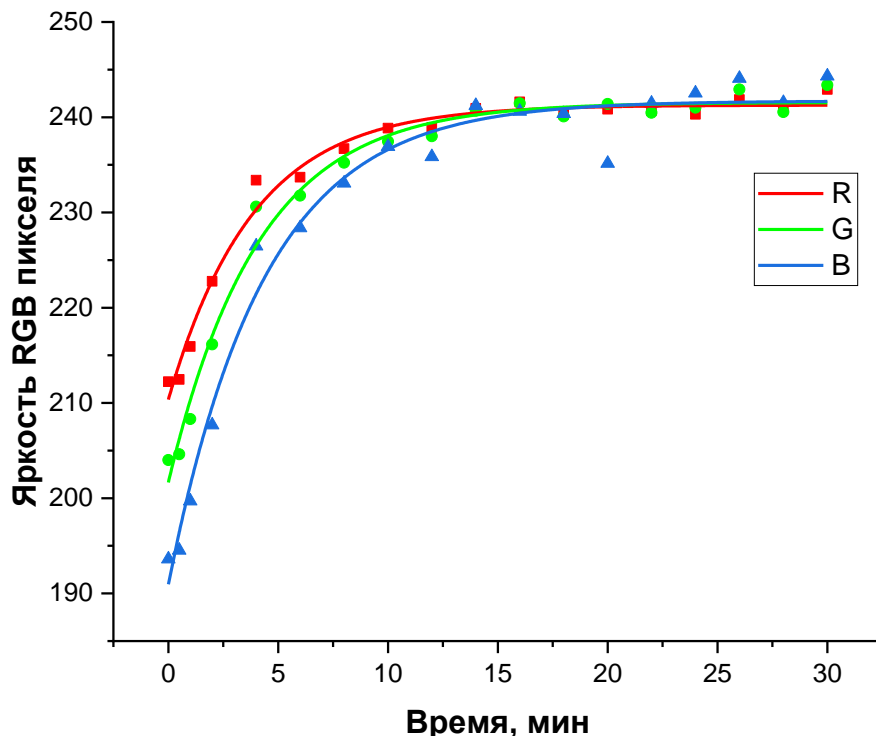


Рисунок 8 - Зависимость яркости пикселя от времени для каждого из цветов RGB-модели.

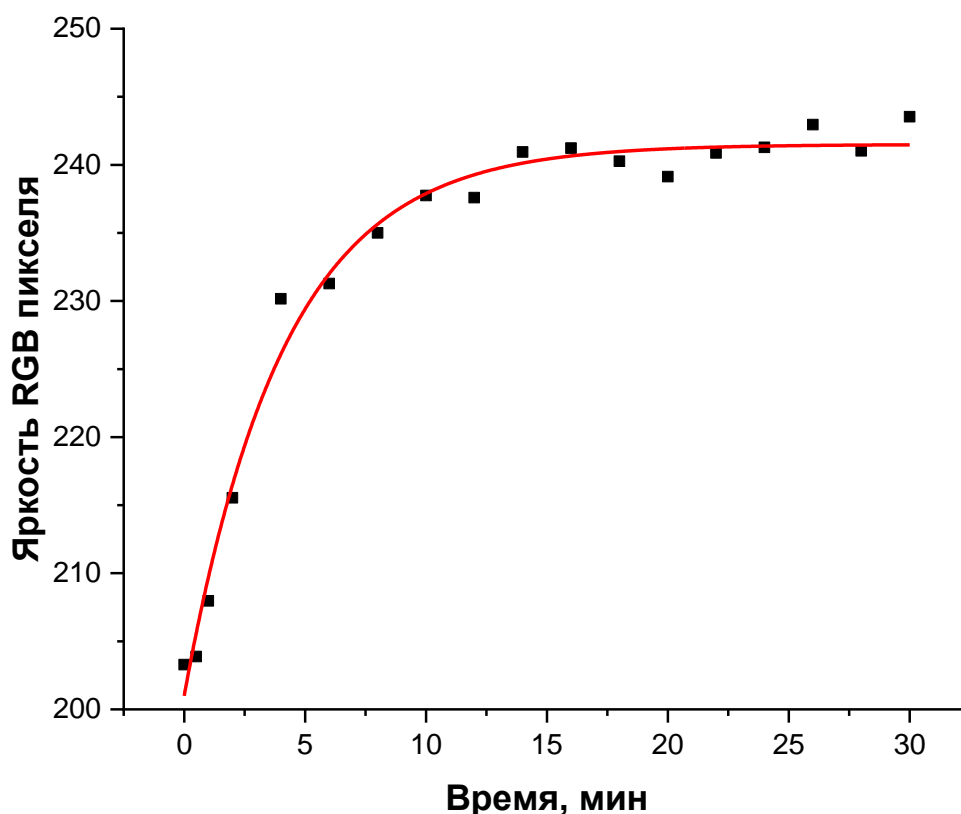


Рисунок 9 - Зависимость усредненной по трём цветам яркости пикселя от времени.

$$T(t, \lambda) \approx A(\lambda) \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (6)$$

Из рисунков 8 и 9 видно, что алгоритмы аппроксимации работают одинаково для усредненных и неусредненных данных, что говорит об их корректной работе и позволяют правильно определить время диффузии τ .

На основе экспериментальных данных были получены значения времени диффузии ОПА в ткани τ с помощью аппроксимации по формуле 5, для каждой длины волны RGB-модели, которые представлены в таблице 8.

Таблица 3 - Значения τ для разных длин волн RGB-модели

| Цвет в RGB модели | Значение τ , мин |
|--------------------|-----------------------|
| R | $3,86 \pm 0,34$ |
| G | $4,10 \pm 0,35$ |
| B | $4,35 \pm 0,46$ |
| Усредненные данные | $4,14 \pm 0,37$ |

Коэффициент диффузии вычисляется по формуле:

$$D = \frac{4l^2}{\pi^2\tau}$$

(7)

где D -коэффициент диффузии, l -толщина образца после взаимодействия с агентом, τ -время диффузии.

$$D = (3.37 \pm 1,73) * 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$$

Коэффициент проницаемости вычисляется по формуле:

$$P = D/l \tag{8}$$

$$P = (7,17 \pm 1,94) * 10^{-5} \text{ см/с}$$

Визуализация образца биоткани при помощи ОКТ и оптического просветления

При помощи спектрального ОКТ GAN930V2-BU (Thorlabs, США), работающего на центральной длине волны 930 нм, был проведен мониторинг исследуемого участка образца биоткани при оптическом просветлении. Срез хрящевой ткани коровы, толщиной $\approx 1,32$ мм был подвержен влиянию ОПА, состоящего из 70% глицерина(VG) и 30% пропиленгликоля (PG) в течение 35 минут.

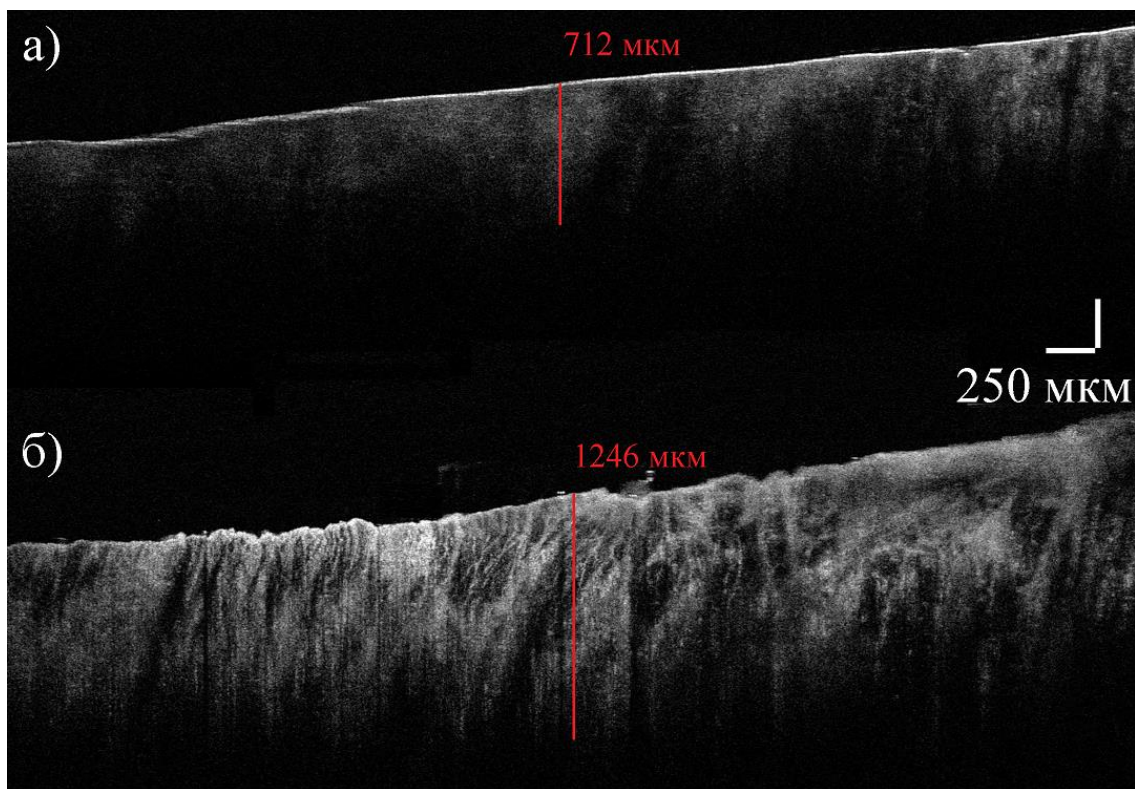


Рис. 10 Изображения образца, полученные на ОКТ: а) до оптического просветления; б) после оптического просветления (на изображении приведена оптическая толщина образца)

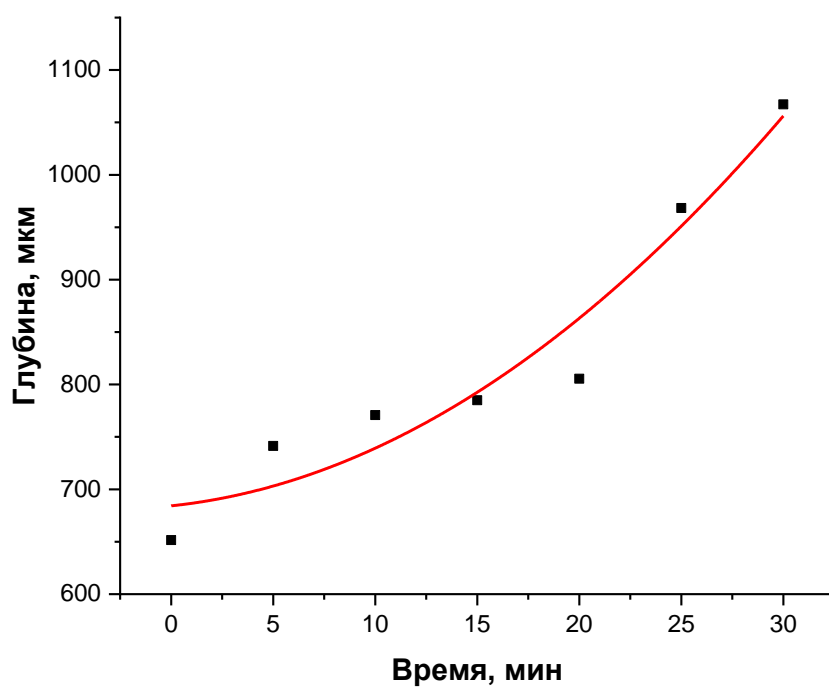


Рисунок 11 - График зависимости глубины зондирования ОКТ от времени воздействия ОПА на ткань.

Заключение. В ходе данной работы было проведено несколько серий опытов по оптическому просветлению хрящевой ткани коровы и визуализации и оценке результатов различными способами. На основе полученных данных можно заключить, что при воздействии ОПА, состоящего из 70% глицерина(VG) и 30% пропиленгликоля (PG), на хрящевую ткань, механизмы дегидратации и согласования показателей преломления компонентов ткани и ОПА приводят к уменьшению рассеивающих характеристик ткани, что делает ее более прозрачной и увеличивает глубину зондирования ткани для ряда оптических методов исследования. Для тонких срезов ткани (≤ 1 мм) время, в течение которого достигаются лучшие результаты оптического просветления при использовании выбранного ОПА, составило $\approx 25-30$ минут, в дальнейшем существенных изменений в оптических свойствах ткани не происходит. Также было выявлено, что при этом времени воздействия ОПА начинает проявляться эффект уменьшения объема биоткани вследствие дегидратации

Исследование с применением спектроскопии комбинационного рассеяния показало, что оптическое просветление хрящевой ткани способно увеличить интенсивность детектируемого ГКР-сигнала наночастиц золота в 5,9 раз при использовании ОПА (70/30 VG/PG).

При использовании метода детектирования изображения с помощью камеры смартфона были получены данные об изменении значений контраста между светлыми и темными участками, что свидетельствует об увеличении разности яркости этих участков. Также при использовании этого метода было установлено, что время, необходимое для достижения максимальных результатов оптического просветления зависит от длины волны детектирования, что может быть объяснено зависимостью показателей преломления ОПА от длины волны, что было также показано в работе. На

длине волны красного света показатель преломления раствора ближе к показателю преломления хрящевой ткани на этой же длине волны, чем на длине волны синего света, вследствие чего, при детектировании в красной области видимого спектра, диффузия ОПА в ткань обеспечивает лучшее согласование показателей преломления, чем на коротких длинах волн.

Метод визуализации с использованием оптической когерентной томографии показал, что оптическое просветление позволяет увеличить глубину зондирования ткани с $\approx 0,71$ до $\approx 1,25$ мм в течение 35 минут.

Эффективность некоторых оптических методов визуализации и исследования хрящевой ткани может быть повышена в несколько раз благодаря оптическому просветлению с применением ОПА на основе глицерина. Так как выбранный ОПА является нетоксичным для организма человека и эффект его воздействия обратим, он может быть использован в некоторых медицинских видах оптической диагностики для увеличения глубины зондирования или улучшения контраста в методах, использующих контраст.

Список литературы.

1. Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, Ю. П. Синичкин, В. В. Тучин, Оптическое просветление склеры глаза *in vivo* под действием глюкозы.- Квантовая электроника, 36:12 (2006), С. 1119–1124 .
2. Табунов С. Н., Гордейчук Т. В., Тхостов М.Х.-М., Никитенко П. Н., Рункевич Е.Н., Кишкевич И. В., Кашицкий Э.С. Исследование воздействия физиотерапевтических факторов на микроциркуляцию поверхностных биотканей.- Доклады БГУИР, 2016.- № 7.- С. 75-79.
3. Тучин В.В., Лазеры и волоконные световоды в биомедицинских исследованиях. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1997.-384 с.
4. D.K. Tuchina, I.G. Meerovich, O.A. Sindeeva, V. V. Zherdeva, A. P. Savitsky, A. A. Bogdanov Jr, V. V. Tuchin, Magnetic resonance contrast agents in optical clearing: Prospects for multimodal tissue imaging. *J. Biophotonics* 13(11),- 2020.
5. Alexey N. Bashkatov, Kirill V. Berezin, Konstantin N. Dvoretzkiy, Maria L. Chernavina, Elina A. Genina, Vadim D. Genin, Vyacheslav I. Kochubey, Ekaterina N. Lazareva, Alexander B. Pravdin, Marina E. Shvachkina, Polina A. Timoshina, Daria K. Tuchina, Dmitry D. Yakovlev, Dmitry A. Yakovlev, Irina Yu Yanina, Olga S. Zhernovaya, Valery V. Tuchin, Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing,- *J. of Biomedical Optics*, 23(9), 091416 (2018).
6. Yong Hong He, Ruikang K. Wang, Dynamic optical clearing effect of tissue impregnated with hyperosmotic agents and studied with optical coherence tomography,- *J. of Biomedical Optics*, 9(1), 2004).
7. Jason Hirshburg, Bernard Choi, J. Stuart Nelson M.D., Alvin T. Yeh Collagen solubility correlates with skin optical clearing,- *J. of Biomedical Optics*, 11(4),- 2006.

