

Влияние иммерсионных агентов на оптические параметры биотканей в процессе лазерной фототермической терапии опухоли: пилотное исследование

© В.Д. Генин^{1,2}, А.Б. Бучарская³, Н.А. Наволокин³, Г.С. Терентюк³, Н.Г. Хлебцов⁴,
В.В. Тучин^{1,2,5}, Э.А. Генина^{1,2}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

³ Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, 410012 Саратов, Россия

⁴ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, ФИЦ „Саратовский научный центр РАН“, 410049 Саратов, Россия

⁵ Институт проблем точной механики и управления РАН, ФИЦ „Саратовский научный центр РАН“, 410028 Саратов, Россия

e-mail: versetty2005@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.12.2021 г.

В окончательной редакции 17.01.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Предложено комбинированное использование иммерсионного агента с низкоинтенсивным лазерным облучением для оптического просветления кожи перед проведением процедуры плазмонной фототермической терапии (ПФТТ). Представлены пилотные результаты исследования влияния иммерсионных агентов на оптические параметры кожи, подкожной соединительной ткани и модельной опухоли у крыс *in vivo* при гипертермии в процессе ПФТТ. В качестве модельной опухоли использовалась модель альвеолярного рака печени — холангиокарциномы, трансплантированной подкожно. Для проведения ПФТТ внутрь опухоли вводились золотые наностержни с полосой поглощения в области излучения диодного лазера (808 nm). Мониторинг изменения коэффициента ослабления света в коже при оптическом просветлении проводился с помощью оптической когерентной томографии. Измерения оптических параметров цельной опухоли и её слоёв проводились на спектрометрах в диапазоне длин волн 350–2200 nm. Получено снижение термического повреждения кожи при проведении ПФТТ с предварительным оптическим просветлением с помощью иммерсионного агента (смесь 70% водного раствора глицерина с 10% ДМСО) и низкоинтенсивного лазерного облучения на длине волны 808 nm.

Ключевые слова: золотые наностержни, ИК лазерное излучение, оптическое просветление, оптические параметры, плазмонная фототермическая терапия.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52628.27-22

1. Введение

Фототермическая терапия (ФТТ), которая относится к методам лечения, основанным на фототермической конверсии под действием светового излучения, привлекает всё большее внимание в связи с её растущим потенциалом в онкологии [1–3]. Из-за наличия серьёзных побочных эффектов традиционных стратегий лечения опухолей, таких как химиотерапия и лучевая терапия, ФТТ со временем может стать их альтернативой. Кроме того, световое облучение даёт возможность управления его временными и пространственными характеристиками в процессе удаления опухолей. Для повышения селективности лазерного излучения могут быть использованы плазмонно-резонансные наночастицы, обладающие локальным поверхностным плазмонным резонансом в определённом спектральном диапазоне [4–6]. Такие

наночастицы, поглощая излучение с соответствующей длиной волны, способны генерировать тепловую энергию в локальном объёме, что позволяет снизить дозу лазерного излучения и уменьшить ущерб, причиняемый окружающим опухоль здоровым тканям. Золотые наностержни (ЗНС) успешно используются при плазмонно-резонансной фототермической терапии (ПФТТ) [7–9]. Использование ближнего ИК излучения, попадающего в окно прозрачности биотканей NIR-I (625–975 nm) [10], для возбуждения плазмонного резонанса даёт преимущество по сравнению с другими спектральными диапазонами, так как меньше поглощается основными хромофорами: меланином, гемоглобином и водой. Однако из-за рассеяния света в тканях кожи глубина проникновения лазерного излучения снижается [11].

Значительное количество работ, посвящённых оптическому просветлению кожи *in vivo* с помощью введе-

ния иммерсионных оптических просветляющих агентов (ОПА), показало большой потенциал данного подхода для повышения визуализации скрытых неоднородностей и кровеносных сосудов [12–15]. В качестве ОПА наиболее часто используются растворы биосовместимых препаратов, таких как глицерин [16,17], полиэтиленгликоль [14,18], глюкоза [15,19] и другие в сочетании с диметилсульфоксидом (ДМСО) [20,21], который способствует увеличению проницаемости эпидермиса [22].

Ранее исследования оптического просветления при комбинированном использовании ОПА и лазерного излучения различных длин волн (CO_2 -лазер и Nd:YAG-лазер, работающий на длинах волн 532 и 1064 nm, диодный лазер, работающий на длине волны 980 nm, и источники широкополосного интенсивного импульсного света, работающие в диапазонах 650–1200, 525–1200 и 470–1400 nm) и интенсивности были представлены в работах [23,24], в которых нагрев поверхности кожи *in vivo* применялся до нанесения ОПА. Результаты исследования кожи на облучённых участках с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) показали увеличение глубины проникновения света на 42% [23]. На основе измерения спектров отражения до и после облучения показано улучшение трансэпидермального проникновения ОПА в 8–9 раз по сравнению с необлучённой кожей [24]. Комбинированное применение ПФТТ подкожных опухолей и оптического просветления кожи впервые было описано в работе [25]. Данный подход может повысить эффективность процедуры, в частности, в работах [11,26] с помощью компьютерного моделирования и экспериментально на образцах ткани *ex vivo* и животных *in vivo* было показано увеличение температуры кожи при её облучении на длине волны 1064 nm и предварительном просветлении.

Исследование термически индуцированных изменений оптических свойств опухолевых тканей при ПФТТ важно как для оценки необходимой дозы вводимых наночастиц и лазерного облучения, так и для разработки математических моделей, которые могут надёжно предсказать результаты процедуры ПФТТ в различных условиях, в том числе при оптическом просветлении поверхностных тканей. Несмотря на многочисленные исследования оптических параметров кожи, крови и опухолей при их нагреве [27–32], исследования изменения оптических параметров *in vivo* в процессе нагрева в присутствии ОПА, а также при ПФТТ с оптическим просветлением практически не проводились.

Таким образом, целью настоящей работы является исследование изменения оптических параметров кожи и модельной опухоли на примере холангиокарциномы при ПФТТ и оптическом просветлении кожи.

Материалы и методы

В качестве ОПА использовались 70%-ный водный раствор глицерина (Gl) и смесь 70% глицерина, 10%

ДМСО и 20% воды (Gl@DMSO). Показатели преломления, измеренные на рефрактометре Аббе ИРФ 454Б2М (ЛЮМО, Россия), составили 1.4400 и 1.4245 на длине волны 589 nm для Gl и Gl@DMSO соответственно.

ЗНС синтезировались в лаборатории нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН. Для предотвращения агрегации частицы функционализировались тиолированным полиэтиленгликолем (молекулярная масса 5000 Да, Nektar, США). Геометрические размеры ЗНС (длина 41 ± 8 nm и диаметр 10 ± 2 nm) определялись по трансмиссионным электронно-микроскопическим изображениям, полученным с помощью электронного микроскопа Libra-120 (CarlZeiss, Germany). Концентрация в суспензии составила $400 \mu\text{g/ml}$ с максимумом оптической плотности (20) на длине волны 800 nm. Высокое значение оптической плотности суспензии ЗНС обеспечивает достаточный нагрев окружающих опухоль тканей [9,32].

В экспериментах использовались 11 белых лабораторных беспородных крыс-самцов весом 160–200 g, полученных из вивария Центра коллективного пользования СГМУ им. В.И. Разумовского.

Для получения модельных опухолей трём крысам вводилась суспензия клеток альвеолярного рака печени РС-1 (холангиокарциномы), полученная из банка опухолевых штаммов ФГБУ „НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина“ Минздрава России. Раковые клетки имплантировали крысам подкожно в область лопатки, по 0.5 ml 25%-ной опухолевой взвеси в растворе Хэнкса.

Перед началом экспериментов животных анестезировали с помощью 0.5 mg/kg препарата „Золетил 50“ (Virbac, Франция). На исследуемых участках кожи шерсть удалялась с помощью одноразовой безопасной бритвы.

В первой серии экспериментов исследовалось влияние различных стимулов по отдельности и в сочетании (однокомпонентный ОПА–Gl и его комбинация с лазерным облучением Gl@laser, двухкомпонентный ОПА–Gl@DMSO и его комбинация с лазерным облучением Gl@DMSO@laser, а также лазерное облучение без ОПА–Laser) на оптические параметры кожи. В эксперименте участвовало 8 здоровых крыс. У каждого животного исследовалось по 2 участка кожи размером 1.5×1.5 cm, расположенных по бокам симметрично относительно позвоночника, которые случайным образом разделялись на 5 групп. Перед началом экспериментов во всех группах регистрировалось ОКТ-изображение интактных участков. Контрольные исследования включали I группу: на поверхность кожи наносился Gl, II группу: на поверхность кожи наносился Gl@DMSO и III группу: кожа подвергалась лазерному облучению на длине волны 808 nm с помощью оптоволоконного лазера LS-2-N-808-10000 (LaserSystems, Ltd., Россия) с диаметром сердцевины $400 \mu\text{m}$ и числовой апертурой 0.2. В IV и V группах на поверхность кожи наносился Gl или Gl@DMSO соответственно, и проводилось облучение. Объём наносимого ОПА составлял 1 ml. Мощность излучения

в группах, подвергнутых лазерному воздействию (III–V), регулировалась оператором таким образом, чтобы поддерживать приблизительно одинаковую температуру на поверхности кожи животных в диапазоне 40–41°C. Средняя мощность составляла 0.9 ± 0.2 W при этом средняя температура на поверхности кожи достигала 40.7 ± 0.4 °C. Для каждого животного мощность облучения в течение всего эксперимента оставалась постоянной. Мониторинг температуры проводился непрерывно с помощью ИК визуализатора IRI4010 (IRYSYS, Великобритания). Для мониторинга состояния кожи использовался спектральный оптический когерентный томограф OCP930SR (Thorlabs, США) с центральной длиной волны излучения 930 ± 5 nm, спектральной шириной 100 nm, продольным и поперечным разрешением 6.2 и 9.6 μ m (на воздухе) соответственно и длиной сканирования 2 mm. Сканирование проводилось каждые 2 min. Общее время мониторинга составило 15 min. При использовании только ОПА (I и II группы) животное находилось на предметном столе ОКТ всё время эксперимента. В группах с использованием лазерного облучения (III–V группы) предметный стол с животным смещался для поочередного облучения и ОКТ-сканирования, при этом лазерное облучение прерывалось на время ОКТ-сканирования (10–20 s).

Во второй серии экспериментов участвовало три крысы с модельными опухолями. При достижении опухолями объема ≥ 3 cm³ двум крысам за час до эксперимента в трех точках опухоли вводилась суспензия ЗНС со скоростью введения 0.1 ml/min. Общий объем введённой суспензии составил 1 ml с концентрацией ЗНС 400 μ g/ml. Этот метод введения приводит к накоплению и удержанию наночастиц в опухоли [33]. Таким образом, концентрация ЗНС из расчета на объем опухоли (около 3 cm³) составила около 133 μ g/cm³.

Перед процедурой ПФТТ на поверхность кожи над опухолью одной из крыс наносился ОПА Gl@DMSO объемом 1 ml и проводилось лазерное облучение мощностью 1 W в течение 10 min, при этом плотность мощности на поверхности составляла приблизительно 1.2 W/cm². Затем мощность лазерного излучения увеличивалась до 2 W, и облучение продолжалось в течение ещё 15 min, при этом плотность мощности на поверхности кожи составляла 2.3 W/cm². Температура поверхности кожи регистрировалась каждые 0.5 min. У второй крысы опухоль облучалась без предварительного просветления кожи в течение 15 min также при плотности мощности 2.3 W/cm². Третьей крысе лазерного облучения не проводилось.

До облучения и сразу после него регистрировались спектры диффузного отражения кожи над опухолью с помощью спектрометров USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) в спектральном диапазоне 420–1000 nm и NIRQuest (Ocean Optics, США) в спектральном диапазоне 930–2125 nm. В качестве источника света использовалась галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США). Для измерения использовался оптический

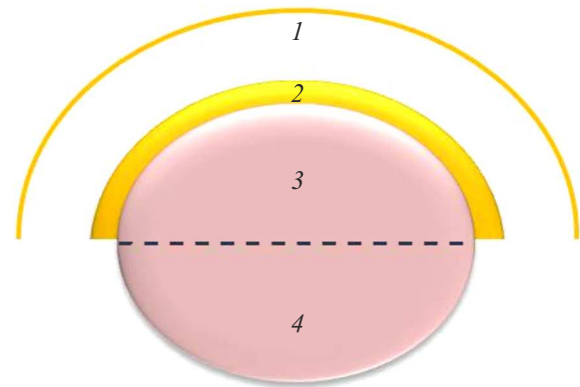


Рис. 1. Схематическое изображение опухоли с прилегающими слоями биотканей: кожа над опухолью (1), подкожный слой соединительной ткани (2), верхняя часть опухоли (3) и нижняя часть опухоли (4).

зонд QR400-7-VIS/NIR (Ocean Optics, США), оснащенный шестью излучающими световодами вокруг одного приёмного волокна с диаметром сердцевины 400 μ m и числовой апертурой 0.22 ± 0.02 . Зонд закреплялся в цилиндрическом держателе с диаметром отверстия, соответствующим диаметру зонда, чтобы обеспечить расстояние 2 mm между поверхностью кожи и зондом. Таким образом, диффузное обратно рассеянное излучение собиралось с площади кожи около 8 mm². Перед началом измерений спектрометры калибровались с использованием эталона отражения WS-1-SL (Labsphere, США).

Затем все три крысы выводились из эксперимента. Слои тканей, подвергнутых облучению, схематично изображены на рис. 1. Опухоли с прилегающими биотканями удалялись и разделялись на следующие слои: кожа над опухолью, подкожный слой соединительной ткани, верхняя часть опухоли и нижняя часть опухоли.

Спектры полного пропускания и диффузного отражения образцов измерялись в диапазоне длин волн 350–2200 nm. Для спектральных измерений использовался спектрофотометр UV-3600 (Shimadzu, Япония) с интегрирующей сферой LISR-3100 (Shimadzu, Япония). Перед проведением измерений образцы помещались между двумя предметными стеклами и закреплялись без сжатия. Толщина образцов измерялась с помощью электронного микрометра с точностью ± 1 μ m в пяти точках образца, после чего результаты усреднялись. Для калибровки спектрофотометра использовался эталон диффузного отражения BaSO₄.

Оптический коэффициент ослабления света оценивался на основе результатов ОКТ-сканирования в соответствии с моделью однократного рассеяния [34]:

$$R(z) = A \exp(-\mu_t z) + B, \quad (1)$$

где $R(z)$ — ОКТ-сигнал, A — коэффициент пропорциональности, равный $P_0 \alpha(z)$; P_0 — оптическая мощность

пучка, падающего на поверхность биоткани, $\alpha(z)$ — отражательная способность биоткани на заданной глубине, определяемая локальным показателем преломления и локальной способностью биоткани рассеивать свет назад, $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ — коэффициент ослабления света биотканью, μ_a — коэффициент поглощения света биотканью, μ_s — коэффициент рассеяния света в биоткани; B — фоновый сигнал.

На рис. 2 представлены методики оценки коэффициента ослабления в случае, когда ОКТ А-скан аппроксимировался одной и двумя экспоненциальными зависимостями. Прямоугольником отмечена область усреднения ОКТ-сигнала (51 А-скан), который выбирался в области интереса. На рис. 2, а представлено типичное изображение интактной кожи, однако данный подход можно было применить как к участкам, подвергнутым воздействию ОПА и лазерного излучения по отдельности, так и к комбинации Gl@laser. В результате воздействия Gl@DMSO@laser в верхней и средней частях дермы происходили такие изменения ОКТ-сигнала, что его невозможно было аппроксимировать одноэкспоненциальной зависимостью, таким образом, возникла необходимость использовать для аппроксимации сигнала две экспоненты (рис. 2, б).

Для оценки значения μ_t в качестве экспоненциального параметра, который наилучшим образом соответствует кривой, использовался нелинейный метод наименьших квадратов [35,36]. Значения μ_t определялись для каждого животного, усреднялись по группам и нормировались на начальное значение. Для каждого среднего значения рассчитывалось стандартное отклонение.

На основе измеренных спектров полного пропускания и диффузного отражения в сферу рассчитывались коэффициент поглощения (μ_a) и транспортный коэффициент рассеяния (μ_s) образцов исследуемых тканей. Для обработки результатов эксперимента и определения оптических параметров использовался комбинированный подход. На первом этапе данные измерений обрабатывались с помощью метода инверсного добавления-удвоения [37]. Затем точность полученных значений μ_a и μ_s улучшалась с помощью инверсного метода Монте-Карло до согласования измеренных и расчетных данных с заданной точностью ($< 0.1\%$) [38].

Результаты и обсуждение

Результаты ОКТ-исследования кожи крыс *in vivo* под действием различных стимулов представлены на рис. 3 и 4. На рис. 3, а, б хорошо видно, что под действием Gl и Gl@DMSO в первую очередь просветляется эпидермис, граница раздела эпидермиса и дермы становится заметна. Эффективность оптического просветления кожи выше при использовании раствора Gl@DMSO, чем Gl, о чём свидетельствует большее увеличение глубины зондирования в первом случае. Данные результаты согласуются с результатами, представленными

ми в работах [20–22], которые показывают увеличение проницаемости эпидермиса при добавлении в раствор просветляющего агента ДМСО. Рисунок 4, а показывает снижение коэффициента ослабления света в коже в процессе оптического просветления на 23 ± 9 и $29 \pm 3\%$ в течение 14 min для Gl и Gl@DMSO соответственно. При этом видно, что для Gl@DMSO наблюдается тенденция к дальнейшему снижению коэффициента ослабления.

Из результатов, представленных на рис. 3, б и 4, а, следует, что при комбинации воздействия Gl с нагревом процесс диффузии глицерина в кожу сопровождается уплотнением ткани, по-видимому, за счёт дегидратации ткани как под действием гипертонического раствора глицерина, так и при повышении температуры. За время наблюдения значение μ_t сначала снижается на $18 \pm 10\%$ в течение 10 min, а затем возрастает практически до начального значения.

Существенные изменения по сравнению с другими группами наблюдались в процессе нагрева кожи, обработанной Gl@DMSO (рис. 3, д). Хорошо видно, что при той же температуре, что и в других группах, происходит расслоение ткани с образованием области отёка. При этом верхняя часть в процессе нагрева уплотняется, о чём свидетельствует рост значения μ_t в среднем в 3.5 ± 1.3 раз, а область под отёком продолжает просветляться, значение μ_t уменьшается в среднем на $20 \pm 8\%$ (рис. 4, б). Данный эффект, по-видимому, связан с действием ДМСО. Известно, что при высоких концентрациях ДМСО может вызывать раздражение кожи, сопровождаемое эпидермальным межклеточным отёком [39]. В данном случае возникновение отёка стимулируется повышением температуры до 41°C , в то время как при температуре 38°C отёка не возникало.

На рис. 3, е видно значительное увеличение яркости изображения поверхности ткани, что говорит о её уплотнении, по-видимому, за счёт дегидратации под действием лазерного нагрева. На рис. 4, а также видно увеличение коэффициента ослабления со временем, в среднем оно составило $28 \pm 6\%$.

Для дальнейших исследований в качестве ОПА был выбран Gl@DMSO, поскольку, несмотря на возникновение отёка, он вызывает наибольшее снижение коэффициента ослабления света в коже.

На рис. 5 представлены этапы пилотного эксперимента с ПФТТ модельной опухоли холангиокарциномы РС-1 при предварительном просветлении кожи, временные зависимости температуры нагрева кожи и спектры диффузного отражения кожи над опухолью, допированной ЗНС, до воздействия, после 10 min воздействия Gl@DMSO@laser и после 15 min ПФТТ. На рис. 5, а хорошо видно, что после Gl@DMSO@laser наблюдается эритема и отёк кожи в месте облучения, что вызывает изменение в спектрах диффузного отражения: снижение коэффициента отражения в полосах поглощения гемоглобина (543 и 577 nm) и воды (1434 и 1958 nm) (рис. 5, с, д). Наблюдаемые различия в регистрируемых величинах диффузного отражения на длинноволновой

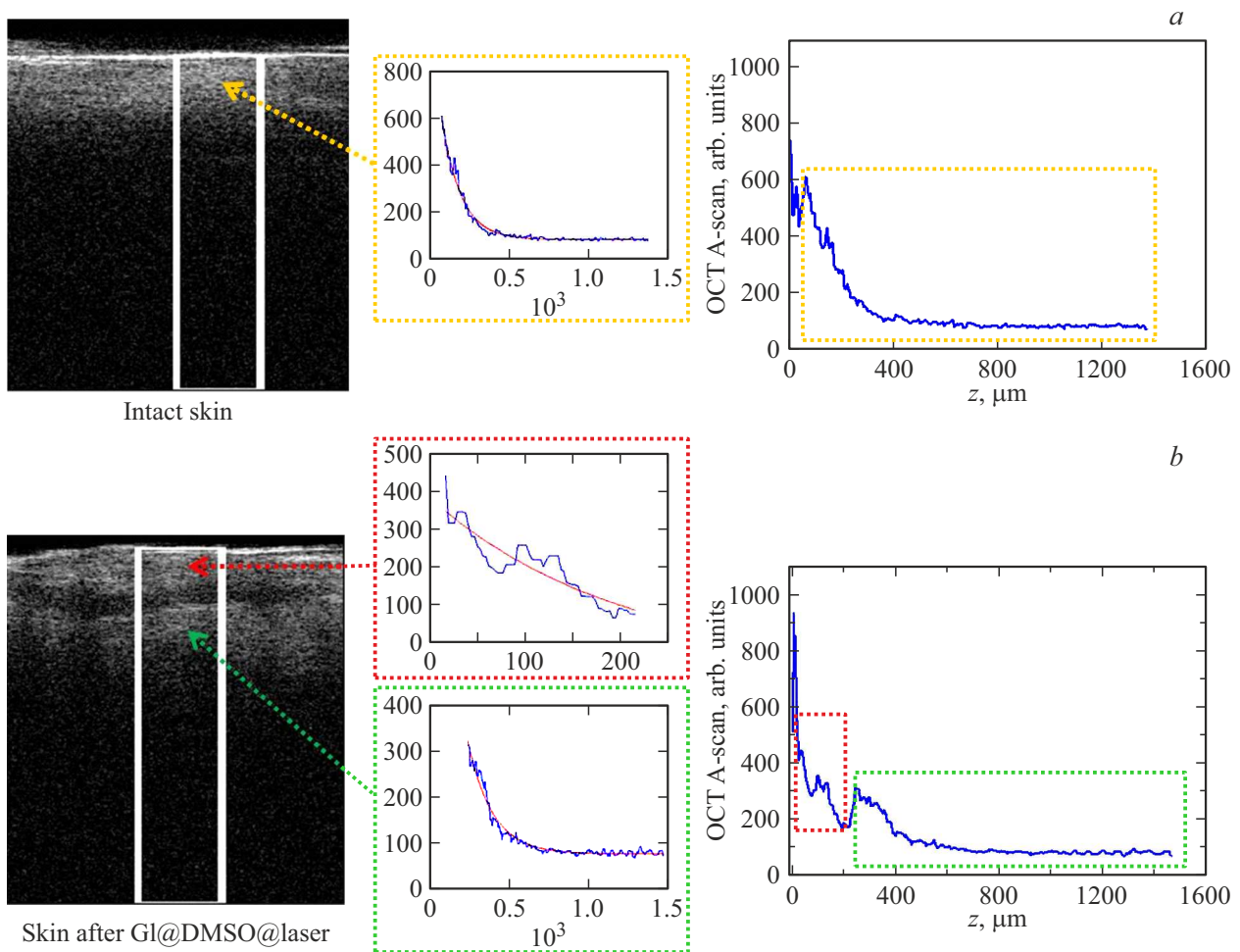


Рис. 2. Типичные ОКТ-изображения участка дермы крысы *in vivo* (В-скан), усредненный А-скан ОКТ-сигнала и аппроксимирующие кривые, построенные с использованием модели однократного рассеяния (а) перед началом воздействия (Intact skin) и (b) после нанесения ОПА и ИК лазерного облучения (Gl@DMSO@laser).

границе диапазона 420–1000 nm и коротковолновой границе диапазона 930–2125 nm объясняются использованием для измерений различных спектрометров (см. раздел Методы и материалы), обладающих различной чувствительностью в данном диапазоне длин волн. Однако взаимное расположение спектров диффузного отражения кожи под действием исследуемых стимулов хорошо согласуется в обоих исследуемых спектральных диапазонах. Рисунок 5, b показывает, что при аналогичном режиме Gl@DMSO@laser, в отличие от крыс без опухоли (рис. 3, d), у крысы с опухолью, допированной ЗНС, наблюдается рост температуры от 41.5°C через 30 s после начала облучения до 46.5°C через 10 min, что, по-видимому, связано с дополнительным влиянием нагрева наночастиц в теле опухоли. Различия между зависимостями температуры нагрева от времени при ПФТТ с предварительным воздействием просветления и без него незначительны и могут быть связаны с различным локальным содержанием наночастиц в области облучения. При этом наблюдаются значительные изменения в спектре диффузного отражения в полосах

поглощения гемоглобина (переход из оксигенированной HbO₂ в дезоксигенированную форму Hb и частичное разрушение гемоглобина) и воды (смещение полос поглощения в более коротковолновую область спектра). Так, для полос поглощения гемоглобина (рис. 5, c) наблюдается переход Q-полос с 543 и 577 nm в одну полосу на 561 nm при ПФТТ после Gl@DMSO@laser, что характерно при дезоксигенации гемоглобина [40]. При ПФТТ без предварительного воздействия наблюдается исчезновение характерных полос поглощения гемоглобина Hb и HbO₂ в данной спектральной области, что может быть связано с коагуляцией белка, которое происходит при нагреве гемоглобина крови [41]. На рис. 5, a видно значительное потемнение и увеличение области поражения на участке, подвергнутом ПФТТ. Полосы поглощения воды на 1434 и 1958 nm для интактной кожи смещаются к 1429 и 1934 nm при нагреве с Gl@DMSO@laser, к 1420 и 1929 nm при ПФТТ после Gl@DMSO@laser и к 1415 и 1922 nm при ПФТТ без предварительного воздействия (рис. 5, d).

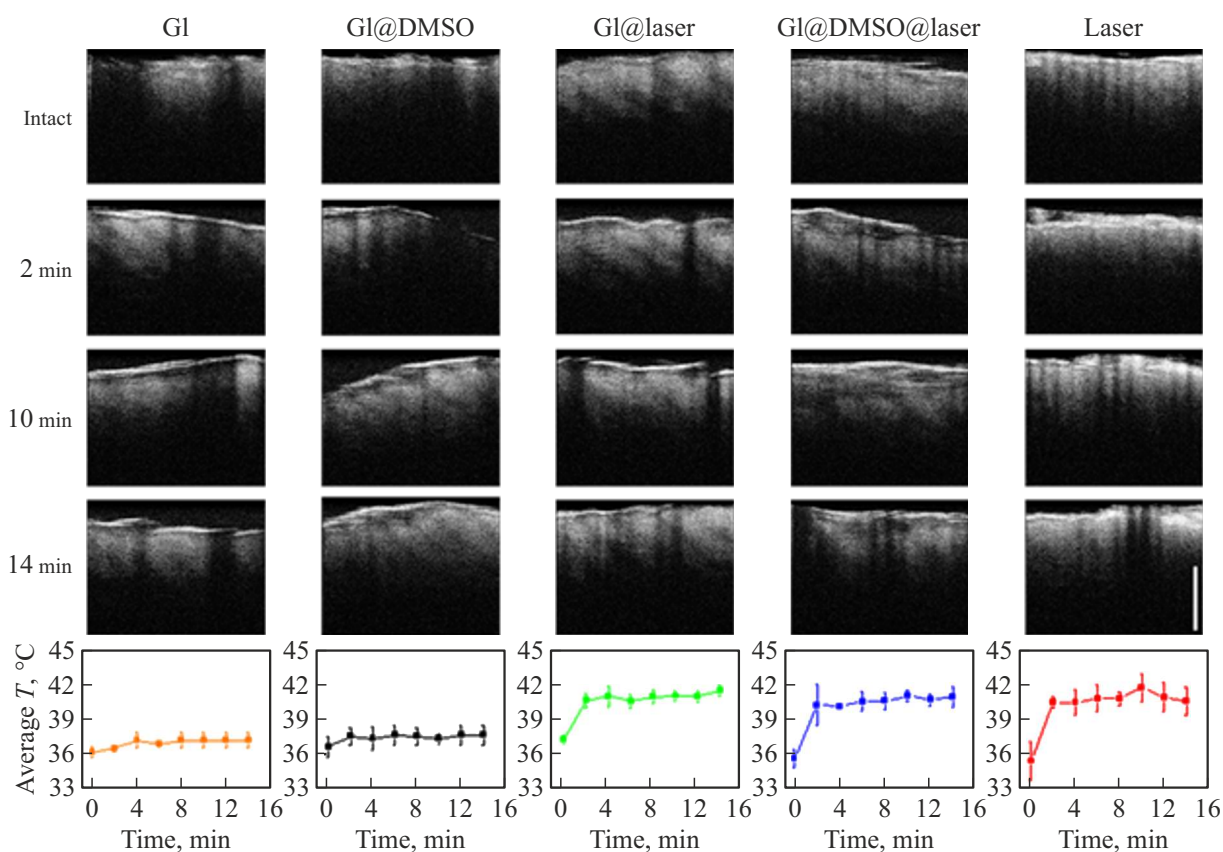


Рис. 3. ОКТ-изображения участков кожи крыс *in vivo*, подвергнутых воздействию (а) водного раствора глицерина (GI) и (б) смеси 70%-ного раствора глицерина с 10% ДМСО (GI@DMSO) при температуре тела, (с) 70%-ного раствора глицерина (GI@laser) и (д) смеси 70%-ного раствора глицерина с 10% ДМСО (GI@DMSO@laser) при лазерном нагреве и (е) лазерного нагрева (Laser). Масштабная метка соответствует $500\ \mu\text{m}$. Тёмные вертикальные полосы на изображениях являются артефактами, возникающими при дыхании животных. Временные колебания среднего значения температуры кожи в месте воздействия в различных группах показаны под соответствующими ОКТ-изображениями.

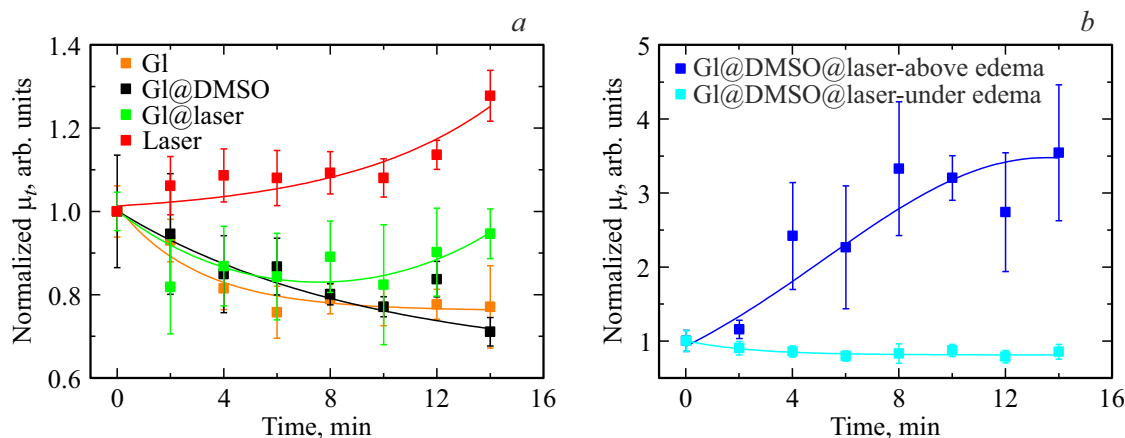


Рис. 4. Временные зависимости усреднённого и нормированного коэффициента ослабления света в исследуемых группах: (а) I (GI), II (GI@DMSO), III (GI@laser) и V (Laser) и (б) IV выше области отёка (GI@DMSO@laser above edema) и ниже области отёка (GI@DMSO@laser under edema).

Помимо изменений поглощающих свойств кожи на спектры отражения оказали влияние изменения её рассеивающих характеристик. Так, под действием

GI@DMSO@laser наблюдался отёк кожи, что привело к снижению коэффициента отражения. При ПФТТ более интенсивное лазерное излучение привело к дегидрата-

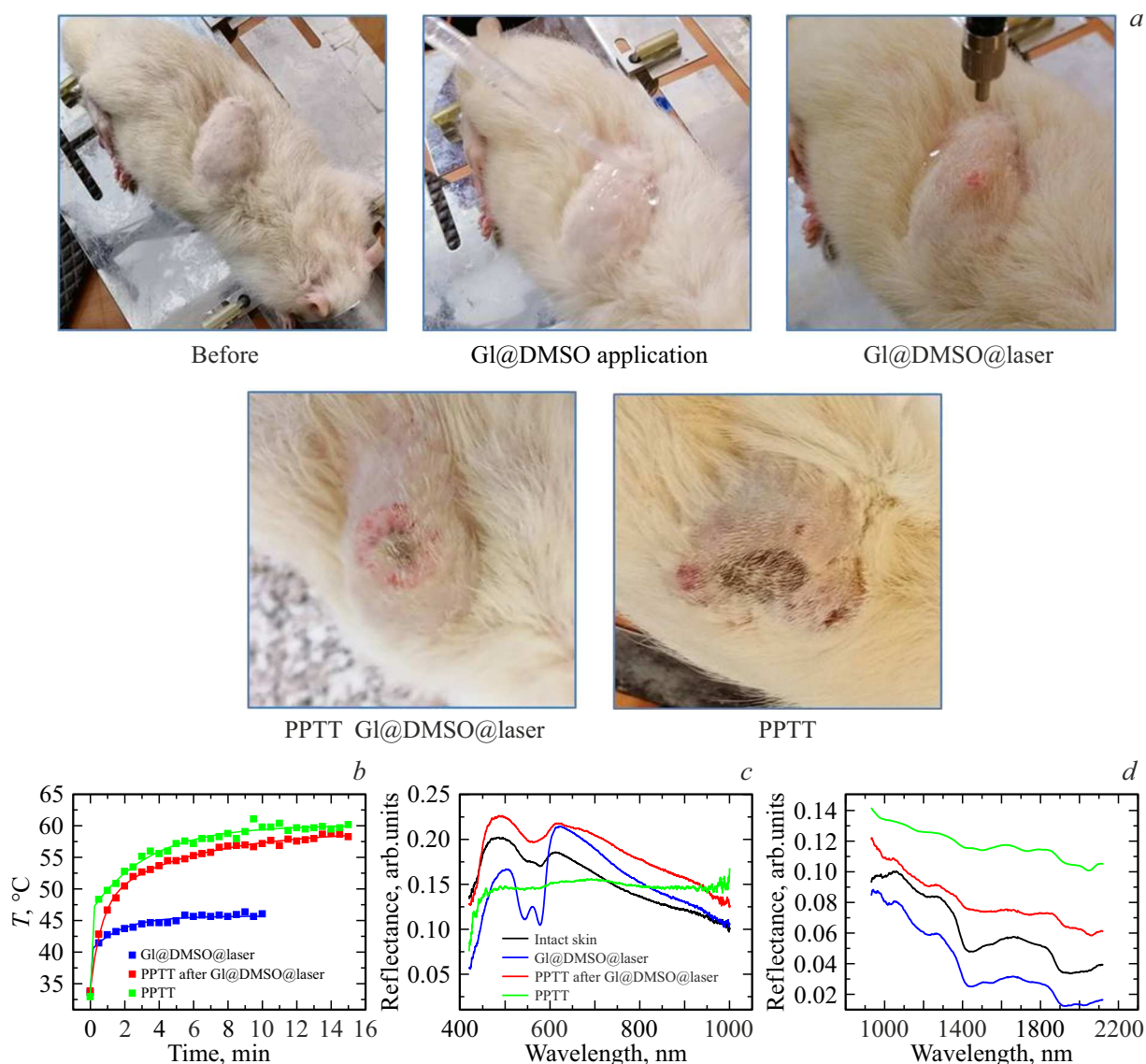


Рис. 5. Фотографии крысы *in vivo* с перевитой опухолью PC-1, допированной ЗНС, демонстрирующие последовательность действий и результат ПФТТ с предварительным просветлением кожи (a): до процедуры (Before), процесс нанесения ОПА (GI@DMSO application), результат низкоинтенсивного лазерного облучения в течение 10 min (GI@DMSO@laser) и с повышением интенсивности в течение 15 min (PPTT after GI@DMSO@laser) и дополнительное изображение опухоли после ПФТТ без предварительного просветления кожи (PPTT). Временные зависимости температуры поверхности кожи крысы при проведении данных процедур (b). Спектры диффузного отражения, измеренные до воздействий и сразу после них в спектральных диапазонах (c) 420–1000 nm и (d) 930–2125 nm.

ции ткани, её уплотнению и, таким образом, к увеличению коэффициента отражения. Обращает на себя внимание тот факт, что предварительное нанесение ОПА снизило степень повреждения кожи и предотвратило необратимые последствия воздействия высокой температуры на ткани, что выражается в менее существенных изменениях спектра отражения при ПФТТ с просветлением, чем при ПФТТ.

На рис. 6 представлены спектральные зависимости оптических параметров исследуемых тканей опухоли у контрольного животного (без введения ЗНС и облучения), при ПФТТ с предварительным нанесением

ОПА и нагревом и при ПФТТ без дополнительных воздействий. На спектрах поглощения исследуемых тканей контрольного животного видны характерные полосы HbO_2 (416–417, 544–548 и 566–574 nm, рис. 6, a, b и d) и воды (1192, 1458 и 1942 nm). В спектре верхней части опухоли наблюдаются полосы поглощения Hb (420 и 552 nm, рис. 6, c), что может быть связано с дезоксигенацией и началом некротических изменений ткани.

В спектре поглощения кожи после процедуры ПФТТ на рис. 6, a (образец 1, рис. 1) хорошо видно увеличение полос поглощения гемоглобина и переход HbO_2 в Hb,

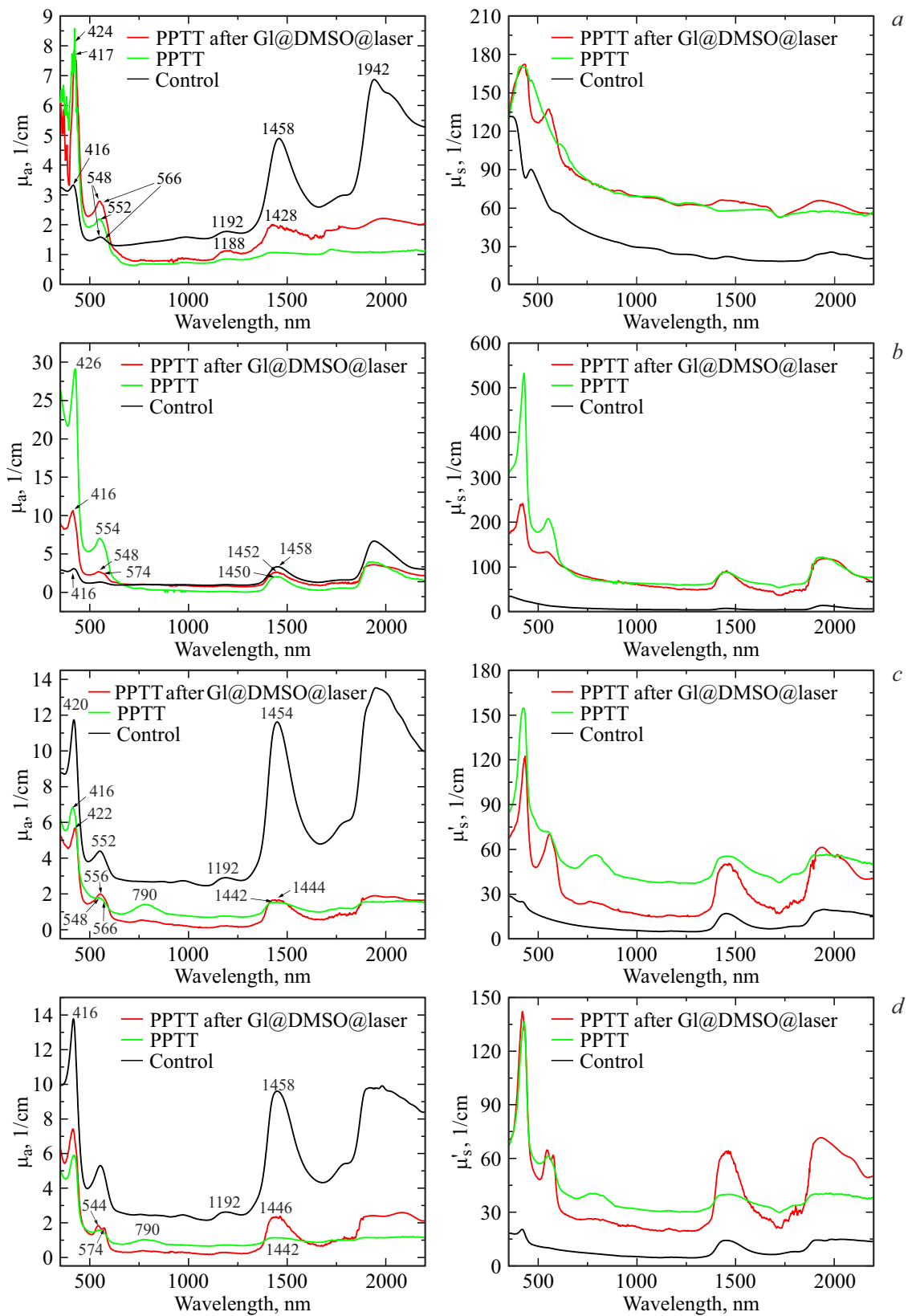


Рис. 6. Коэффициент поглощения (μ_a) и транспортный коэффициент рассеяния (μ'_s) тканей контрольной опухоли, не подвергавшейся процедуре ПФТТ (Control), опухоли после ПФТТ с предварительным просветлением (PPTT after Gl@DMSO@laser) и ПФТТ без предварительного просветления (PPTT): (a) кожи над опухолью, (b) подкожной соединительной ткани, (c) верхней части опухоли и (d) нижней части опухоли.

что свидетельствует о повреждении сосудов при ПФТТ. Кроме того, в спектре кожи после ПФТТ практически отсутствуют полосы поглощения воды, что говорит о значительной дегидратации кожи в месте облучения. В спектре кожи после ПФТТ с предварительным просветлением пики поглощения воды присутствуют, но смещаются с 1192 и 1456 nm в сторону более коротких длин волн к 1188 и 1428 nm за счёт нагрева ткани. Это смещение наиболее значительное для образца кожи над опухолью, чем для остальных исследуемых биотканей.

Повреждение подкожной соединительной ткани (образец 2, рис. 1) после ПФТТ с просветлением также менее выражено, чем при ПФТТ, так как в спектре поглощения присутствуют характерные полосы оксигемоглобина (416, 548 и 574 nm).

В спектрах поглощения и рассеяния опухоли (рис. 6, c, d, образцы 3 и 4, рис. 1) хорошо виден пик поглощения ЗНС (790 nm). Смещение максимума поглощения относительно максимума оптической плотности суспензии (800 nm) объясняется, по-видимому, влиянием рассеяния ткани. Поскольку поглощение в области 790 nm выше для животного, подвергнутого ПФТТ, то, следовательно, локальная концентрация наночастиц у него выше. Это может объяснить тот факт, что в результате нагрева ЗНС в теле опухоли при ПФТТ происходит более сильная дегидратация ткани. Это проявляется в более существенном уменьшении значения μ_a в полосах поглощения воды и смещении максимума поглощения в область более коротких длин волн.

Транспортный коэффициент рассеяния снижается с увеличением длины волны, при этом более крутой наклон спектра соответствует большим значениям температуры в каждом слое. Увеличение значений μ_s в образцах кожи и подкожной ткани после ПФТТ объясняется коагуляцией тканей, которая вызывает разрушение более крупных рассеивателей, таких как эритроциты, а также стенок кровеносных сосудов и коллагеновых пучков в дерме и соединительной ткани. В теле опухоли также происходит коагуляция белка, особенно в области контакта с ЗНС.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы. Halldorsson [29] наблюдал более высокое оптическое поглощение в термически денатурированной крови по сравнению с нативной оксигенированной кровью при 633 и 1064 nm. Трансформация между HbO₂ и Hb была количественно проанализирована Jia и др. [30]. Непрерывный нагрев на водяной бане до температуры 60°C приводил к превращению HbO₂ в Hb. Эффект тепловых изменений в спектрах поглощения воды наблюдался при прямых измерениях образцов воды и исследованиях лазерной терапии. Jansen и др. [42] показали, что пик поглощения воды около 1.94 μm смещался в сторону более коротких длин волн с повышением температуры и достигал 1.92 μm при 49°C. Синий сдвиг пиков поглощения воды при повышении температуры был показан в работах [43–45]. Полученные результаты также хорошо согласуются с данными работ [27,28], в

которых сообщалось об изменениях оптических параметров кожи при нагревании. Небольшие различия в значениях, указанных в литературе, скорее всего, обусловлены различиями в экспериментальных условиях, теоретических моделях и методах обработки тканей, используемых в исследованиях.

Исходя из данных, представленных на рис. 6, c, d, можно предположить, что нагрев тела опухоли при ПФТТ без предварительного просветления (РПТТ), по-видимому, был более существенным, чем при ПФТТ с предварительным просветлением (РПТТ after Gl@DMSO@laser), за счёт большей локальной концентрации частиц в месте облучения. Однако за счёт оптического просветления поверхности температура нагрева при обеих процедурах была сравнима, что позволило достичь близких результатов. Компьютерное моделирование распространения света в опухоли при предварительном оптическом просветлении кожи подтверждает данное предположение.

Заключение

В настоящей работе впервые представлены изменения оптических свойств верхней и нижней частей модельной опухоли у крыс (холангиокарцинома PC-1), кожи и подкожной соединительной ткани, расположенных над опухолью, вызванные повышением температуры при проведении процедуры ПФТТ с предварительным оптическим просветлением кожи в спектральном диапазоне от 350 до 2200 nm. Результаты показывают, что основные различия в поглощении вызваны дезоксигенацией крови, нагревом внутритканевой воды и дегидратацией тканей в области облучения, в то время как различия в рассеянии вызваны разрушением микрососудов с последующей коагуляцией белков. Отмечено снижение термического повреждения кожи в результате проведения ПФТТ при предварительном оптическом просветлении с использованием иммерсионного агента и низкоинтенсивного лазерного облучения.

Результаты данного исследования могут послужить основой для уточнения моделей ПФТТ и повышения эффективности процедуры за счёт оптического просветления кожи.

Соблюдение этических стандартов

Эксперименты проводились в соответствии с международными этическими нормами Европейской конвенции защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986) и с рекомендациями комитета по этике ФГБОУ ВО Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол № 6 от 06.02.2018 г.).

Финансирование работы

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 19-32-90224 (в части развития метода ПФТТ) и № 20-52-56005 (в части определения оптических параметров злокачественных новообразований), а также грантом Фонда содействия инновациям УМНИК-19 (г)/Хелснет-НТИ — 2019 № 15929ГУ/2020 от 07.23.2020 (код 0059878, заявка У-65096).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] J.R. Melamed, R.S. Edelman, E.S. Day. *ACS Nano*, **9** (1), 6 (2015). DOI: 10.1021/acsnano.5b00021
- [2] H.S. Jung, P. Verwilt, A. Sharma, J. Shin, J.L. Sessler, J.S. Kim. *Chem. Soc. Rev.*, **47** (7), 2280 (2018). DOI: 10.1039/c7cs00522a
- [3] X.-Q. Xu, Y. He, Y. Wang. *Cell Rep. Phys. Sci.*, **2** (5), 100433 (2021). DOI: 10.1016/j.ccrp.2021.100433
- [4] X. Huang, P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed. *Lasers Med. Sci.*, **23** (3), 217 (2008). DOI: 10.1007/s10103-007-0470-x
- [5] N.S. Abadeer, C.J. Murphy. *J. Phys. Chem.*, **120** (9), 4691 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11232
- [6] Y. Liu, P. Bhattarai, Z. Dai, X. Chen. *Chem. Soc. Rev.*, **48** (7), 2053 (2019). DOI: 10.1039/c8cs00618k
- [7] M.M. Arnida, A. Janát-Amsbury, C.M. Ray, C.M. Peterson, H. Ghandehari. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77** (3), 417 (2011). DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.11.010
- [8] L.M. Maestro, E. Camarillo, J.A. Sanchez-Gil, R. Rodriguez-Oliveros, J. Ramiro-Bargueno, A.J. Caamano, F. Jaque, J.G. Solea, D. Jaque. *RSC Adv.*, **4** (96), 54122 (2014). DOI: 10.1039/C4RA08956A
- [9] A.B. Bucharskaya, G.N. Maslyakova, M.L. Chekhonatskaya, G.S. Terentyuk, N.A. Navolokin, B.N. Khlebtsov, N.G. Khlebtsov, A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V.V. Tuchin. *Lasers Surg. Med.*, **50** (10), 1025 (2018). DOI: 10.1002/lsm.23001
- [10] A.N. Bashkatov, K.V. Berezin, K.N. Dvoretzkiy, M.L. Chernavina, E.A. Genina, V.D. Genin, V.I. Kochubey, E.N. Lazareva, A.B. Pravdin, M.E. Shvachkina, P.A. Timoshina, D.K. Tuchina, D.D. Yakovlev, D.A. Yakovlev, I.Yu. Yanina, O.S. Zhernovaya, V.V. Tuchin. *J. Biomed. Opt.*, **23** (9), 091416 (2018). DOI: 10.1117/1.JBO.23.9.091416
- [11] J.-I. Youn. *Med. Laser*, **10** (3), 146 (2021). DOI: 10.25289/ML.2021.10.3.146
- [12] V.V. Tuchin. *J. Phys. D Appl. Phys.*, **38** (15), 2497 (2005). DOI: 10.1088/0022-3727/38/15/001
- [13] D. Zhu, J. Wang, Z. Zhi, X. Wen, Q. Luo. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 1 (2010). DOI: 10.1117/1.3369739
- [14] R. Shi, L. Guo, C. Zhang, W. Feng, P. Li, Z. Ding, D. Zhu. *J. Biophotonics.*, **10** (6–7), 887 (2017). DOI: 10.1002/jbio.201600221
- [15] D.K. Tuchina, P.A. Timoshina, V.V. Tuchin, A.N. Bashkatov, E.A. Genina. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **25** (1), 7200508 (2019). DOI: 10.1109/JSTQE.2018.2830500
- [16] X. Wen, Z. Mao, Z. Han, V.V. Tuchin, D. Zhu. *J. Biophotonics*, **3** (1–2), 44 (2010). DOI: 10.1002/jbio.200910080
- [17] V.D. Genin, E.A. Genina, V.V. Tuchin, A.N. Bashkatov. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **14** (5), 2142006 (2021). DOI: 10.1142/S1793545821420062
- [18] Д.К. Тучина, В.Д. Генин, А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, В.В. Тучин. *Опт. и спектр.*, **120** (1), 36 (2016). DOI: 10.7868/S0030403416010220 [D.K. Tuchina, V.D. Genin, A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V.V. Tuchin. *Opt. Spectr.*, **120** (1), 28 (2016). DOI: 10.1134/S0030400X16010215].
- [19] J. Wang, N. Ma, R. Shi, Y. Zhang, T. Yu, D. Zhu. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **20** (2), 7101007 (2014). DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2289966
- [20] J. Jiang, R.K. Wang. *Phys. Med. Biol.*, **49** (23), 5283 (2004). DOI: 10.1088/0031-9155/49/23/006
- [21] J. Jiang, M. Boese, P. Turner, R.K. Wang. *J. Biomed. Opt.*, **13** (2), 0211052008 (2008). DOI: 10.1117/1.2899153
- [22] E.A. Genina, A.N. Bashkatov, E.A. Kolesnikova, M.V. Basco, G.S. Terentyuk, V.V. Tuchin. *J. Biomed. Opt.*, **19** (2), 021109 (2014). DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.021109
- [23] O. Stumpp, A.J. Welch, J. Neev. *Lasers Surg. Med.*, **37** (4), 278 (2005). DOI: 10.1002/lsm.20237
- [24] C. Liu, Z. Zhi, V.V. Tuchin, Q. Luo, D. Zhu. *Lasers Surg. Med.*, **42** (2), 132 (2010). DOI: 10.1002/lsm.20900
- [25] G. Terentyuk, E. Panfilova, V. Khanadeev, D. Chumakov, E. Genina, A. Bashkatov, V. Tuchin, N. Khlebtsov, B. Khlebtsov. *Nanoresearch*, **7** (3), 325 (2014). DOI: 10.1007/s12274-013-0398-3
- [26] Y. Chu, Sh. Liao, H. Liao, Y. Lu, X. Geng, D. Wu, J. Pei, Y. Wang. *CCS Chem.*, **3**, 3289 (2021). DOI: 10.31635/ccschem.021.202101539
- [27] J. Laufer, R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis, M. Cope. *Phys. Med. Biol.*, **43** (9), 2479 (1998). DOI: 10.1088/0031-9155/43/9/004
- [28] T.W. Iorizzo, P.R. Jermain, E. Salomatina, A. Muzikansky, A.N. Yaroslavsky. *Sci. Rep.*, **11** (1), 754 (2021). DOI: 10.1038/s41598-020-80254-9
- [29] T. Halldorsson. In: *Proc. 4th Congr. Int. Soc. Laser. Surgery* (1981), p. 1–8.
- [30] H. Jia, B. Chen, D. Li. *Lasers Med. Sci.*, **32** (3), 513 (2017). DOI: 10.1007/s10103-017-2143-8
- [31] N. Manuchehrabadi, Y. Chen, A. LeBrun, R. Ma, L. Zhu. *J. Biomech. Eng.*, **135** (12), 121007 (2013). DOI: 10.1115/1.4025388
- [32] V.D. Genin, E.A. Genina, A.B. Bucharskaya, M.L. Chekhonatskaya, G.S. Terentyuk, D.K. Tuchina, N.G. Khlebtsov, V.V. Tuchin, A.N. Bashkatov. *J. Biomed. Photon. & Eng.*, **4** (1), 010505 (2018). DOI: 10.18287/JBPE18.04.010505
- [33] H. Xie, B. Goins, A. Bao, Z.J. Wang, W.T. Philips. *Int. J. Nanomed.*, **7**, 2227 (2012). DOI: 10.2147/IJN.S30699
- [34] R.K. Wang, V.V. Tuchin. *Optical coherence tomography. Light scattering and imaging enhancement*, ed. by V.V. Tuchin (Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht, London, 2013), p. 665–742. DOI: 10.1007/978-1-4614-5176-1_16
- [35] D.J. Faber, F.J. van der Meer, M.C.G. Aalders, T.G. van Leeuwen. *Opt. Express*, **12** (19), 4353 (2004). DOI: 10.1364/OPEX.12.004353
- [36] Э.А. Генина, Н.С. Ксенофонтова, А.Н. Башкатов, Г.С. Терентюк, В.В. Тучин. *Квант. электр.*, **47** (6), 561 (2017). DOI: 10.1070/QEL00000 [E.A. Genina, N.S. Ksenofontova, A.N. Bashkatov, G.S. Terentyuk, V.V. Tuchin. *Quant. Electr.*, **47** (6), 561 (2017). DOI: 10.1070/QEL16378].

- [37] S.A. Prael, M.J.C. van Gemert, A.J. Welch. *Appl. Opt.*, **32** (4), 559 (1993). DOI: 10.1364/AO.32.000559
- [38] А.Н. Башкагов, Э.А. Генина, М.Д. Козинцева, В.И. Кочубей, С.Ю. Городков, В.В. Тучин. *Опт. спектр.*, **120** (1), 6 (2016). DOI: 10.7868/S0030403416010050 [A.N. Bashkatov, E.A. Genina, M.D. Kozintseva, V.I. Kochubei, S.Yu. Gorodkov, V.V. Tuchin. *Opt. Spectr.*, **120** (1), 1 (2016). DOI: 10.1134/S0030400X16010045].
- [39] A. Pagnoni, A. Knuettel, P. Welker, M. Rist, T. Stoudemayer, L. Kolbe, I. Sadiq, A.M. Kligman. *Skin Res. Technol.*, **5** (2), 83 (1999). DOI: 10.1111/j.1600-0846.1999.tb00120.x
- [40] S.A. Prael. Optical absorption of haemoglobin [Электронный ресурс]. URL: <http://www.omlc.ogi.edu/spectra/>
- [41] J.K. Barton, G. Frangineas, H. Pummer, J.F. Black. *Photochem. Photobiol.*, **73** (6), 642 (2001). DOI: 10.1562/0031-8655(2001)073<0642:cpitpt>2.0.co;2
- [42] E.D. Jansen, T.V. van Leeuwen, M. Motamedi, C. Borst, A. Welch. *Laser Surg. Med.*, **14** (3), 258 (1994). DOI: 10.1002/lsm.1900140308
- [43] V.S. Langford, A.J. McKinley, T.I. Quickenden. *J. Phys. Chem. A.*, **105** (39), 8916 (2001). DOI: 10.1021/JP010093M
- [44] B.I. Lange, T. Brendel, G. Huttmann. *Appl. Opt.*, **41** (27), 5797 (2002). DOI: 10.1364/ao.41.005797
- [45] E.H. Otal, F.A. Icyn, F.J. Andrade. *Appl. Spectrosc.*, **57** (6), 661 (2003). DOI: 10.1366/000370203322005355