

Министерство образования и науки Российской Федерации

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

Кафедра оптики и биофотоники

**Неинвазивная регистрация циркулирующих в кровотоке  
клеток меланомы без использования экзогенных красителей с  
помощью фотоакустического проточного цитометра**

**АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 2 курса 253 группы

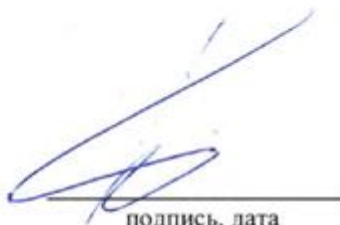
направления 03.04.02 «физика»

физического факультета

Лариной Екатерины Михайловны

Научный руководитель

д.ф.-м.н., профессор  
должность, уч. степень, уч. звание



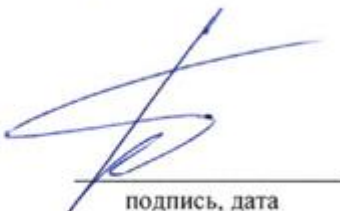
подпись, дата

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.ф.-м.н., профессор  
должность, уч. степень, уч. звание



подпись, дата

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Саратов 2016 г.

## ВВЕДЕНИЕ

В выпускной квалификационной работе представлены результаты исследований, проведённых с помощью техники фотоакустической проточной цитометрии.

Актуальность описываемых научно-исследовательских работ заключается в необходимости развития методов детектирования циркулирующих в кровотоке клеток меланомы. Данный тип рака кожи был выбран объектом изучения в связи с тем, что он является одним из наиболее опасных злокачественных новообразований человека. Меланома часто рецидивирует и быстро даёт метастазы, которые распространяются лимфогенным и гематогенным путём почти во все органы, поэтому смертность от этого заболевания чрезвычайно высока – до 80% [1].

Для решения задачи распознавания меланомы на ранних стадиях перспективны методы оптической физики и биофизики, например, проточная цитометрия и, в частности, один из её методов – проточная фотоакустическая цитометрия.

Изучаемый метод является одной из новейших разработок в области проточной цитометрии, это открывает широкие возможности для исследовательской деятельности по данному направлению, что и определяет научную новизну представленной работы.

Целью данной выпускной квалификационной работы было применить и закрепить на практике полученные теоретические знания при прохождении курсов магистратуры по направлению «Биофотоника» на физическом факультете Саратовского государственного университета.

Одной из задач выпускной работы является также развитие навыков ведения самостоятельной научно-исследовательской деятельности, систематизации и анализа полученных экспериментальных данных.



Представленное исследование состояло из двух этапов: первый – тестовые измерения *in vitro*. Задачей этого этапа было доказать, что сконструированная фотоакустическая система способна детектировать сигнал от клеток меланомы.

Второй этап – измерения *in vivo*. Для этого этапа были подготовлены модели меланомы на живых мышах с помощью подкожной инъекции раковых клеток. Фотоакустический сигнал детектировался в кровеносных сосудах мышинного уха *in vivo*. Таким образом производился подсчёт циркулирующих в кровеносной и лимфатической системах клеток метастазирующей меланомы.

Проведённые исследования подтвердили, что техника проточной фотоакустической цитометрии является эффективным инструментом для мониторинга метастазов меланомы.

Данная выпускная квалификационная работа состоит из следующих разделов: 1 Теоретические основы метода, 1.1 Проточная цитометрия. Основные сведения, 1.2 Фотоакустическая цитометрия, 1.3 Меланома, факторы и причины развития, 2 Экспериментальные работы, 2.1 Экспериментальная установка, 2.2 Обработка регистрируемого сигнала, 2.3 Предварительные эксперименты, 2.4 Первый этап исследований (*in vitro*), 2.4.1 Регистрация сигнала от клеток меланомы, помещённых в чашку Петри, 2.4.2 Регистрация сигнала от клеток меланомы, помещённых в микротрубочку, 2.5 Второй этап исследований (*in vivo*), 3 Результаты проведённых исследований и дальнейшие направления развития технологии.

Положения и результаты, выносимые на защиту: подтверждение актуальности разработки оптической технологии для диагностики меланомы на ранних стадиях; доказательство преимуществ фотоакустического метода по сравнению с другими видами проточной цитометрии; описание результатов проведённых экспериментальных исследований; обозначение путей усовершенствования использованной технологии.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе **1 Теоретические основы метода** показана актуальность поиска новых более эффективных и надёжных путей диагностики заболеваний, которые в то же время не наносят вред организму. К таким методам относится техника проточной цитометрии, а такая её модификация, как проточная фотоакустическая цитометрия является одним из наиболее современных и прогрессивных методов диагностики раковых заболеваний.

Преимуществами данного подхода являются неинвазивность и отсутствие необходимости использования экзогенных биомаркеров. Это приближает условия анализа к условиям живого организма, вследствие чего, результаты исследования являются более точными.

В пункте **1.1 Проточная цитометрия. Основные сведения** более подробно освещаются основные аспекты техники проточной цитометрии, т.к. этот метод является основой подхода, использованный в исследованиях данной выпускной квалификационной работы.

Проточная цитометрия — метод оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов, который основан на регистрации рассеянного лазерного излучения при прохождении клетки в струе жидкости через лазерный пучок, причём, степень угловой дисперсии рассеянного излучения позволяет получить информацию о размерах и структуре клетки. В этом случае физические свойства клеток (размер и цитоплазматическая гранулярность) могут быть измерены на любой отдельной неокрашенной клетке. Клетки также могут быть помечены специфическими красителями, окрашивающими ДНК, РНК или белок, или целым набором флуорохромконъюгированных антител, специфичных для мембран и внутриклеточных компонентов клеток [2].

Проходя через оптическую систему прибора (линзы, фильтры, двухцветные зеркала), сигнал от молекулы-флуорофора регистрируется

фотоэлектронным умножителем, который преобразует его в электрические сигналы, поддающиеся компьютерной обработке [3]. Схема описанного процесса изображена на рисунке 1.

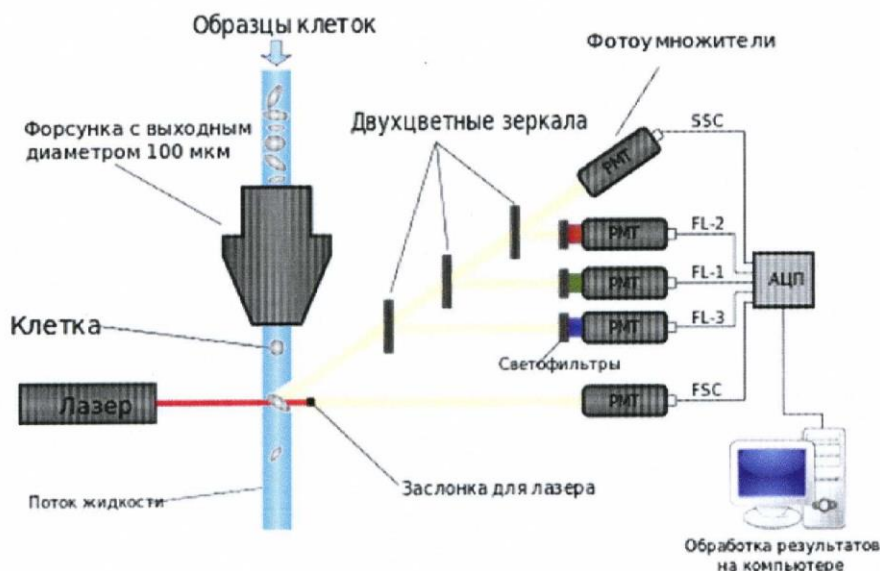


Рисунок 1 - Схема проточного цитометра [4].

**Пункт 1.2 Фотоакустическая цитометрия** более подробно освещает теоретические основы используемой в экспериментах техники фотоакустической проточной цитометрии.

Регистрация акустических волн является основой фотоакустических методов [5]. Причиной возникающих эффектов, дающих основу описываемому методу, являются возбуждаемые импульсным лазером при поглощении в клетке тепловые волны. Информативные возможности этого метода позволяют оценивать тепловые, оптические и акустические свойства биоткани, зависящие от особенностей ее структуры.

Схематическое представление некоторых методов фотоакустики, применяемых для исследования биотканей, дано на рисунке 2. Возбуждающий лазерный пучок падает на поверхность образца, длина волны света настроена в резонанс с полосой поглощения интересующего компонента биоткани, соответственно, оптическая энергия поглощается средой. В конденсированной



среде скорость распада возбужденных состояний из-за столкновений гораздо выше, чем из-за радиационных процессов, поэтому большая часть энергии превращается в тепло. Нагрев, зависящий от времени, приводит ко всем упомянутым выше тепловым и термоупругим эффектам.

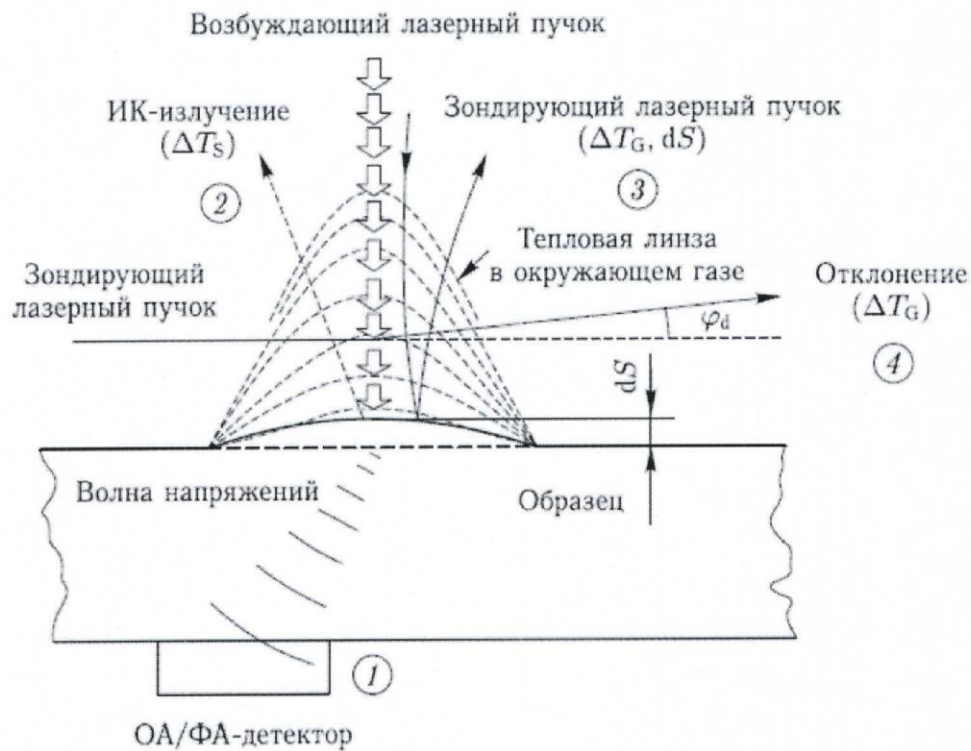


Рисунок 2 – Схема некоторых фотоакустических методов, применяемых для исследования биологических тканей:  $\Delta T_S$  — изменение температуры образца;  $\Delta T_G$  — изменение температуры окружающего газа;  $dS$  — термоупругая деформация;  $\phi_d$  — угол отклонения зондирующего лазерного пучка. 1 — оптоакустический метод (ОА); 2 — Оптотермическая радиометрия (ОТР-метод); 3 — метод «тепловой линзы»; 4 — метод «дефлекции» [6].

В формирование фотоакустического сигнала вносят вклад любые (однократно или многократно) рассеянные фотоны, поэтому глубина, с которой можно получать изображение, увеличивается по сравнению с использованием чисто оптических методов, основанных на детектировании только баллистических или квазибаллистических фотонов.

Оптоакустические или фотоакустические технологии с использованием сигналов от эндогенных хромофоров (меланина и гемоглобина) или экзогенных красителей и наночастиц обеспечивают визуализацию опухолей *in vivo* с высоким разрешением на глубине до 3–5 см.

**Пункт 1.3 Меланома, факторы и причины развития** даёт представление о таком заболевании, как меланома. Данное заболевание - это злокачественная опухоль, возникающая в результате перерождения меланоцитов.

Основной причиной перерождения меланоцитов медики называют появление дефекта в молекуле ДНК пигментной клетки. Указанный процесс может обостряться следующими факторами: наличие невусов (родинок); белая кожа, веснушки и светлые волосы, голубые глаза; семейный анамнез; избыточное воздействие ультрафиолетового излучения и загара.

Меланома - агрессивная злокачественная опухоль, она характеризуется бурным и ранним метастазированием. Прогноз лечения меланомы напрямую зависит от стадии заболевания, при раннем обнаружении это заболевание поддаётся успешному лечению. Именно поэтому очень важно научиться распознавать проблему на начальных стадиях.

**Раздел 2 Экспериментальная часть** вкратце описывает порядок выполнения экспериментальных работ, проведённых автором в составе группы студентов и аспирантов Shanghai Jiao Tong University. Этапы осуществлённых исследований и использованное оборудование более подробно раскрываются в последующих пунктах работы.

**Пункт 2.1 Экспериментальная установка** посвящён описанию принципа работы применяемой в ходе исследований фотоакустической установки. Её основные элементы: твердотельный Nd:YAG лазер (длина волны: 1064 нм, ширина импульса 2 нс, частота повторений 5 кГц), который затем модифицируется цилиндрической линзой в линию и фокусируется объективом (40X, NA = 0,6) на образец.

Фокусировка лазера была обеспечена цилиндрической линзой, узкая щель служит пространственным фильтром, который придаёт пучку лазера вид линии,



что делает его более чистым, свободным от шумов. Фокусировка лазера осуществляется перпендикулярно направлению потока крови и охватывает всю ширину соответствующей артерии уха, чтобы обеспечить получение сигнала только от изучаемой области.

Изображение записывается на CCD-камеру. Ультразвуковой преобразователь (центральная частота: 10 МГц, диаметр элемента: 3 мм), использовали для регистрации фотоакустического сигнала.

В пункте **2.2 Обработка регистрируемого сигнала** представлены основные этапы обработки зарегистрированного сигнала в среде Matlab. Основные процессы, которым подвергался фотоакустический сигнал: устранение шума путём вейвлет преобразования и процедура усреднения сигнала. Графики, приведённые в данном пункте, показывают, что после обработки сигнал становился более чётким.

В пункте **2.3 Предварительные эксперименты** освещаются результаты проведения предварительных экспериментов на чёрном волосе человека, целью которых было показать, что разработанная система проточного фотоакустического цитометра способна детектировать сигналы от заданного объекта. Фотоакустический сигнал был получен только при фокусировке лазерного пятна на волос. Это явилось доказательством получения сигнала от заданного объекта. Результаты приведенного эксперимента проиллюстрированы на рисунках и графиках данного раздела.

Раздел **2.4 Первый этап исследований (in vitro)** представляет последовательность выполнения исследовательских работ по регистрации фотоакустического сигнала от клеток меланомы B16F10 в in vitro условиях. Целью этого этапа было доказать, что разработанная технология способна регистрировать фотоакустический сигнал от клеток меланомы.

Первый шаг in vitro исследований описывается в пункте **2.4.1 Регистрация сигнала от клеток меланомы, помещённых в чашку Петри**, где приведена последовательность выполнения эксперимента и полученные результаты.



**Пункт 2.4.2 Регистрация сигнала от клеток меланомы, помещённых в микротрубочку** описывает следующий шаг *in vitro* экспериментов. Помещение клеток меланомы в микротрубочку усложняет регистрацию сигнала, но, в то же время, приближает условия *in vitro* эксперимента к живому организму, т.к. при *in vivo* исследованиях регистрация клеток происходит в сосудах. Результаты эксперимента показаны на рисунках и графиках данного пункта.

В разделе **2.5 Второй этап исследований (*in vivo*)** рассказывается о порядке проведения *in vivo* экспериментов. Для этих исследований были взяты пять бесшёрстных лабораторных мышей возраста от шести до восьми недель и весом 18-22 грамма (Shanghai SLAC Laboratory Animal Co.). Мышам были сделаны в хвост инъекции клеток меланомы B16F10 в количестве  $10^7$  для каждой мыши.

Регистрация фотоакустического сигнала осуществлялась в артерии, расположенной в ухе мыши. Непосредственно перед каждым исследованием каждой мыши делалась анестезия.

Длительность каждой регистрации фотоакустического сигнала составляла 10 минут. Данные исследования проводились в течение четырёх недель.

Результатом каждого эксперимента являлся фотоакустический сигнал, зарегистрированный от циркулирующих в кровеносной системе клеток меланомы B16F10.

Как и на предыдущих этапах (предварительный эксперимент и *in vitro* исследования) полученный от клеток сигнал был подвергнут процедурам устранения шума и усреднению.

Последний этап исследований длился четыре недели, в ходе которых проводился еженедельный мониторинг циркулирующих в кровотоке метастазов меланомы, путём их подсчёта. Проведённый мониторинг выявил, что после первой недели после инъекции раковых клеток в кровоток за 10 мин наблюдения регистрируются в среднем две опухолевые клетки; после двух недель – 6; после трёх недель – 12; после четырёх 22. Результаты мониторинга отображены на графике рисунке 3.

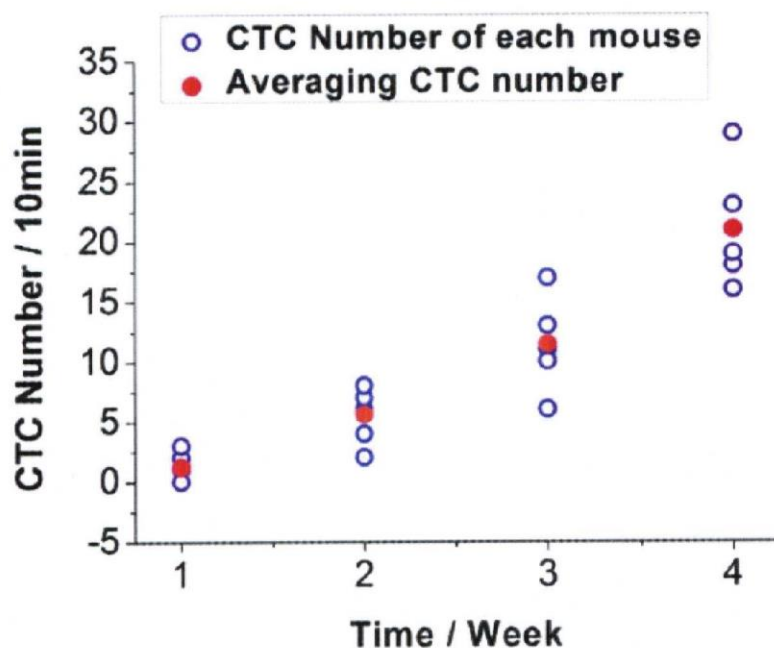


Рисунок 3 – Результаты проведённых *in vivo* экспериментов на бесшёрстных лабораторных мышах в течение четырёх недель [7].

**Раздел 3 Результаты проведённых исследований и дальнейшие направления развития технологии** демонстрирует результаты, полученные в ходе выполнения экспериментов.

По результатам проведённых экспериментов можно судить, что разработанная и описываемая в данной работе установка фотоакустического проточного цитометра справляется с поставленной перед ней задачей регистрации фотоакустического сигнала от циркулирующих в кровотоке клеток меланомы. Поэтому очевидна необходимость продолжать исследования в данном направлении.

Также в этом разделе рассмотрены возможные пути дальнейшего развития и улучшения описанной технологии фотоакустической проточной цитометрии.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент проточная цитометрия является одним из наиболее прогрессивных и современных подходов в диагностике заболеваний. Особенно активно она применяется в области исследования состава крови и диагностики раковых заболеваний. Это обусловлено самой технологией данного метода, которая заключается в детектировании отдельных клеток, что позволяет проводить их подсчёт и сортировку. Результаты таких исследований позволяют оценить состояние организма и поставить точный диагноз.

На базе научной группы биомедицинской инженерии Шанхайского Jiao Tong Университета (School of Bio-Medical Engineering Shanghai Jiao Tong University), была разработана установка для неинвазивной регистрации фотоакустического сигнала от циркулирующих в кровотоке клеток меланомы. Также была проведена серия экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, направленных на то, чтобы доказать способность разработанной установки регистрировать сигнал от интересующих клеток.

Результаты проведённых исследований показали, что описываемая в работе техника фотоакустической цитометрии обеспечивает надёжную регистрацию сигнала от клеток меланомы.

В связи с вышесказанным, уже намечены пути по усовершенствованию разработанной установки, а именно повышение стабильности регистрируемого сигнала и увеличение чувствительности прибора. Также перспективное направление развития данной технологии – это поиск возможности регистрации фотоакустического сигнала от клеток других типов рака.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. (редколлегия). Злокачественные новообразования в России в 2008 г. (заболеваемость и смертность), 256 с. — М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена «Росмедтехнологий», 2010
2. Полетаев А.И. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине / ИНТ серия «Общие проблемы физико-химической биологии». — М., 1989. — Т. 12. — 88 с.
3. Приезжев А.В., Тучин В. В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1989.
4. <https://www.google.com/imgres?imgurl>
5. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2-е изд. М.: Физматлит, 2010.
6. Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. М.: Физматлит, 2012.
7. Ping Yang, Rongrong Liua, Zhenyu Niua, Yuanzhen Suoa, Hao Hea, Xunbin Wei. Noninvasive and label-free detection of circulating melanoma cells by in vivo photoacoustic flow cytometry, SPIE, 2016.