

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи



Гамаюнова Екатерина Алексеевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ
ОПТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

Специальность 1.3.6. – Оптика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
Кочубей Вячеслав Иванович

Саратов 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Исследования при температурах от комнатной до физиологической	14
1. Интенсивность флуоресценции уменьшается при повышении температуры для кожи и других тканей, не содержащих липидов.....	16
2. Интенсивность флуоресценции увеличивается для жировых тканей. Это объясняется увеличением текучести липидов, претерпевающих фазовые изменения при определенных температурах.....	16
1.2 Исследования при температурах от физиологической и выше	17
1.3 Исследования при помощи физических и математических моделей биологических тканей.....	20
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ	26
1.1 Материалы.....	26
1.2 Влияние методики регистрации на получаемые температурные зависимости оптических характеристик биологических объектов	26
2.3. Методика регистрации спектров	29
2.3.1 Методика регистрации спектров полного пропускания и диффузного отражения с интегрирующей сферой.....	29
2.3.2 Методика регистрации спектров коллимированного пропускания.....	30
ГЛАВА 3. ИЗМЕРЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ИНТЕГРИРУЮЩЕЙ СФЕРЫ	33
3.1 Различия оптических характеристик биологических объектов при комнатной и физиологической температурах	33
3.2 Изменения оптических характеристик кожи при сильном нагреве.....	47
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ КОЛЛИМИРОВАННОГО ПРОПУСКАНИЯ СВЕТА БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ	55
4.1. Динамика изменений коэффициентов ослабления коллимированного излучения биологических объектов при ступенчатом повышении температуры	56
4.1.1 Без поддержания влажности	56

4.1.2 С поддержанием влажности.....	58
4.2 Динамика изменений коэффициентов ослабления коллимированного излучения биологических объектов, выдерживаемых при различных температурах.....	62
ГЛАВА 5. РЕГИСТРАЦИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НАНОЧАСТИЦ, ВНЕДРЕННЫХ ПОД КОЖУ.....	70
5.1. Регистрация люминесценции при помощи широкоапертурных фотообъективов.....	70
5.2 Синтез и характеристика наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ для контроля состояния биологической ткани.....	73
5.3 Регистрация спектров люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ при сборе излучения в малой апертуре.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Оптические свойства биологических тканей могут меняться при изменении физического состояния этих тканей. Одним из основных параметров мониторинга физиологических процессов в организме является изменение внутренней термодинамической температуры органов и тканей [1]. На основе информации о распределении зависимости изменения оптических свойств от внутренней температуры биологических тканей можно делать выводы о состоянии и функционировании органов [2], о реакции человеческого организма на внешние воздействия. В дальнейшем эту информацию можно использовать для диагностики заболеваний внутренних органов и осуществления мониторинга воспалительных процессов в организме, тем самым, развить и оптимизировать методы лазерной терапии и оптической диагностики, такие как лазерная термотерапия, фотодинамическая терапии, нанотермометрия (использование спектров люминесценции наночастиц, введенных в ткань, для определения температуры).

На данный момент опубликовано достаточное количество исследований об оптических свойствах разных биологических тканей. В настоящее время в основном исследуются изменения оптических свойств биологических тканей, происходящие при повышенных температурах (до температуры коагуляции ткани) [3, 4, 5] и при комнатной температуре образцов. К сожалению, несмотря на тот факт, что оптические свойства биотканей изменяются даже при повышении от комнатного до физиологического диапазона температур, то есть диапазона нормального функционирования организма [6, 7, 8], основная часть исследований при физиологической температуре выполнены несколько десятилетий назад. Данные разрозненны и явно недостаточны.

Возникает вероятность того, что использование литературных данных с некоторой вероятностью может привести к неправильной оценке условий

распространения света через биологическую ткань в живом объекте. В свою очередь, некорректные данные об оптических свойствах биологических тканей при физиологической температуре могут привести к недостоверным результатам при медицинской оптической диагностике или терапии. Соответственно, ввиду недостаточности информации, возникает необходимость уточнения и получения новых данных об оптических характеристиках биотканей при физиологической температуре.

В связи с вышесказанным, исследования температурных зависимостей оптических свойств биологических объектов, несомненно, являются актуальными.

Одной из перспективных методик измерения внутриклеточной температуры является нанотермометрия (использование наночастиц и наноустройств в качестве термометров). Работа нанотермометров может быть основана на различных физических процессах – изменения проводимости, фазового состояния, химическом взаимодействии с окружением, изменении оптических свойств наночастиц. Эта методика позволяет с высокой разрешающей способностью измерять внутриклеточную температуру, что позволяет исследовать клеточную физиологию и может открыть особенности метаболизма клетки и ее реакцию на различные внешние раздражители [9, 10], однако в диагностических целях такие измерения не могут быть проведены неинвазивно.

В данной методике изменение температуры ткани определяется с помощью спектров люминесценции наночастиц, внедренных в биологическую ткань. Для этого, как правило, используют регистрацию люминесценции в широкоугольном режиме, что повышает интенсивность регистрируемого сигнала. В то же время это дает ряд сложностей при определении температуры ткани по спектрам люминесценции наночастиц. При прохождении люминесценции через ткань спектры искажаются, так как поглощение и рассеяние люминесценции на разных длинах волн различно. Степень искажения зависит, в том числе, и от угла сбора люминесценции. Для учета искажений необходимо знание значений

коэффициентов поглощения и рассеяния света биотканью и их зависимостей от температуры, что является достаточно сложной задачей. Альтернатива этому методу является использование данных по ослаблению света в режиме коллимированного пропускания.

Целью диссертационной работы является выявление закономерностей изменения оптических свойств различных биологических тканей в зависимости от температуры.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Исследование различий в оптических характеристиках биологических объектов (кожи, подкожной жировой и мышечной тканей), находящихся при комнатной (25 °С) и физиологической (38–39 °С) температурах;
- Исследование изменения оптических характеристик (коэффициентов поглощения, рассеяния и фактора анизотропии) биологических объектов при сильном нагреве;
- Исследования изменений коэффициента ослабления коллимированного излучения биологических объектов при нагревании до температуры 60 °С;
- Проведение синтеза наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, определение температурных зависимостей их спектров люминесценции;
- Исследование изменений спектров люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, находящихся под слоем кожи, при сборе излучения в малой апертуре;
- Исследование изменений спектров коллимированного пропускания и люминесценции апконверсионных наночастиц при помощи широкоапертурных фотообъективов.

Объекты исследования

Объектами исследования являлись образцы кожи, жировой и мышечной ткани белых половозрелых крыс линии Wistar. При проведении экспериментов на животных соблюдались принятые международные этические нормы [11]. Исследования с участием лабораторных животных проходили с соблюдением

необходимых нормативных актов (Хельсинкской декларации 2000 г. о гуманном отношении к животным и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977)). Получена рекомендация комитета по этике ГБОУ ВПО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ по протоколу № 8 от 10.04.2018.

Научная новизна работы

Впервые показаны обратимые изменения коэффициентов поглощения и рассеяния, а также фактора анизотропии рассеяния кожи, жировой и мышечной ткани при изменении их температуры в диапазоне от комнатной до физиологической.

Показано, что при нагреве мышечной ткани от комнатной до физиологической температуры изменяется спектральная зависимость фактора анизотропии при практической неизменности коэффициентов поглощения и рассеяния.

Выявлены закономерности изменения оптической плотности исследованных образцов при нагреве вплоть до 60 °С.

Разработана методика определения температуры наночастиц CuInS_2 по спектрам их люминесценции.

Показано, что при прохождении лазерного излучения с длиной волны 800 нм, используемого для лазерной термотерапии, через такую многослойную среду, как кожа/жировая/мышечная ткань крысы изменение температуры от комнатной до физиологической приводит к уменьшению поглощения в коже и увеличению в мышечной ткани.

Впервые показано, что при регистрации сквозь кожу крысы люминесценции наночастиц CuInS_2 , внедренных в подкожный слой, зависимость от температуры отношения интенсивностей люминесценции на двух фиксированных длинах волн, соответствующих полувысоте линии люминесценции свободных наночастиц, позволяет выявить вызванные температурой фазовые изменения липидов кожи.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы дают основу для дальнейших научных исследований оптических свойств биологических тканей при изменении температуры. Данные исследования могут способствовать созданию малоинвазивного метода диагностики и терапии заболеваний внутренних органов и осуществления мониторинга воспалительных процессов в организме, и развить и оптимизировать методы лазерной терапии и оптической диагностики.

Основные результаты и положения, выносимые на защиту:

1. Повышение температуры мышечной ткани крысы от комнатной до физиологической приводит к увеличению фактора анизотропии рассеяния ткани от 5 % до 50 % в зависимости от длины волны в диапазоне 350-1100 нм, при этом коэффициенты поглощения и рассеяния практически не изменяются.

2. Коэффициенты поглощения и рассеяния кожи крысы, полученные при температуре 25 °С, при прохождении света со стороны эпидермиса и со стороны дермы, различаются следующим образом: коэффициент поглощения выше в среднем в 1,3–1,7 раз, а транспортный коэффициент рассеяния ниже в 1,2–1,9 раз в зависимости от длины волны в диапазоне 350–1100 нм. При повышении температуры кожи до физиологической, одновременно с ростом поглощения и уменьшением рассеяния, наблюдается сближение значений коэффициентов до 1,1-1,3 раз.

3. Показано, что отношение интенсивностей люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ на полувысоте спектральной линии их люминесценции линейно зависит от температуры наночастиц.

4. При помещении наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ под дерму кожи крысы изменение линейности отношения интенсивностей их люминесценции на полувысоте спектральной линии, вызванное ослаблением люминесценции в коже, позволяет выявить температуры фазовых переходов в липидах эпидермиса и дермы.

Степень достоверности и апробация результатов

1. Достоверность научных результатов подтверждается:
2. Использованием современного научно-исследовательского оборудования и программного обеспечения и применением апробированных методик измерений и расчёта.
3. Адекватностью используемых теоретических моделей.
4. Объёмом использованного в работе материала и применением традиционных статистических методов обработки результатов.
5. Воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.
6. Опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных изданиях.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствии с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами: Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущей научной школы Российской Федерации НШ-7898.2016.2; Грант Российского научного фонда № 19-12-00118 «Методы контроля процессов лазерной термотерапии по спектрам люминесценции наночастиц».

Основные результаты и положения диссертации были представлены, доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях:

- Saratov Fall Meeting, SFM'20 - 8th International Symposium “Optics and Biophotonics” – 24th International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2020, Saratov, Russia;
- XI-й НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «Presenting Academic Achievements to the World», Apr 2020, Saratov, Russia;
- 19th International Conference on Laser Optics, ICLO 2020 (6th International Symposium on Lasers in Medicine and Biophotonics), Nov 2020, St Petersburg, Russia;

- Saratov Fall Meeting, SFM'21 - 9th International Symposium “Optics and Biophotonics” – 25th International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2020, Saratov, Russia;

- Ежегодная Всероссийская научная школа - семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2021», Nov 2021, Saratov, Russia;

- SPIE BiOS 2021, Jan 2021, San Francisco, CA, USA;

- Saratov Fall Meeting, SFM'22 - 10th International Symposium “Optics and Biophotonics” – 26th International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2020, Saratov, Russia.

Личный вклад автора диссертации

В рамках выполнения диссертационного исследования автор принимал непосредственное участие на всех этапах проведенных исследований: от реализации поставленных научным руководителем задач до обсуждения результатов и написания статей. Автор лично принимал участие в проведении экспериментальных исследований, аналитической и статистической обработке полученных данных, анализе и обсуждении полученных результатов, изложении полученных фактических данных в материалах диссертационной работы, статьях, подготовке докладов на научно-практических конференциях.

Публикации результатов исследований

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 6 работ в изданиях, рекомендованных ВАК, и зарубежных изданиях, индексируемых «Scopus» и «Web of Science».

Публикации в журналах, входящих в Перечень ВАК:

1. Гамаюнова (Козлова) Е. А., Доронкина А. А., Лазарева Е. Н., Тучина Д. К., Кочубей В. И., Янина И. Ю., 2022 Различия оптических свойств мышечной ткани крысы при комнатной и физиологической температурах // Известия

Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2022. Т. 22, вып. 4. С. 350–356 (K1)

2. **Е.А. Козлова**, В.И. Кочубей Синтез и характеристика наночастиц CuIn_2S // Оптика и спектроскопия, 2020, том 128, вып. 10. С. 1548-1553 DOI: 10.21883/OS.2020.10.50030.144-20 (K1)

Публикации в трудах конференций, индексируемых международными базами данных «Scopus» и «Web of Science»:

3. A A Skaptsov, S O Ustalkov, A H M Mohammed, O A Savenko, A S Novikova 2 , **E A Kozlova** 1 and V I Kochubey Fabrication and characterization of biological tissue phantoms with embedded nanoparticles // IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 917 (2017) 042003 doi:10.1088/1742-6596/917/4/042003

4. I.Yu. Yanina, **Е.А. Козлова**, V.I. Kochubey Changes in the spectral characteristics of biological tissues depending on temperature // Proc. of SPIE Vol. 11641, 116410X (5 March 2021)· doi: 10.1117/12.2588231

5. Sergey O. Ustalkov; **Ekaterina A. Kozlova**; Olga A. Savenko; Ammar H. M. Mohammed; Vyacheslav I. Kochubey; Alexander A. Skaptsov Influence of excitation power density on temperature dependencies of $\text{NaYF}_4 : \text{Yb}, \text{Er}$ nanoparticles luminescence spectra // Proc. SPIE. 10336, Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII, 1033614. (March 24, 2017) doi: 10.1117/12.2269297

6. **Kozlova, E.A.**, Kochubey, V.I. Synthesis and Characterization of CuInS_2 Nanoparticles // Proceedings - International Conference Laser Optics 2020, ICLO 2020, 2020, 9285790

Статьи в сборниках РИНЦ:

7. Казадаева Н. И., Кочубей В. И., **Гамаюнова Е. А.** Сравнение ослабления люминесценции, проходящей через биологическую ткань при разных режимах регистрации // В сборнике: МЕТОДЫ КОМПЬЮТЕРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ - 2021. сборник статей Всероссийской школы-

семинара. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского. Саратов, 2021. С. 121-124

8. Кочубей В. И., Гамаюнова Е. A synthesis and characterization of CuInS₂ nanoparticles // Presenting Academic Achievements to the World. Natural Science. Материалы XI научной конференции молодых ученых. Саратов, 2021. С. 79-84

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка цитируемой литературы, состоящего из 66 наименования. Диссертация изложена на 103 страницах, содержит 59 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор данных литературы по существующим на сегодняшний день результатам исследований зависимости оптических свойств биологической ткани от температуры показал, что эта тема актуальна, но до конца не изучена [12, 13]. Существует огромный пласт работ, освещающий влияние лазерного излучения на биологические ткани, но в этих работах не учитываются температурные зависимости и их влияние на оптические свойства изучаемых тканей. Основная часть этих работ направлена на изучение зависимости оптических свойств биологических тканей от длины волны подающего излучения [14], разработку новых методов и техник измерений спектральных характеристик [15, 16, 17] и математических моделей и программ для моделирования процессов происходящих в биотканях при взаимодействии с лазерным излучением [18, 19].

Переходя к обзору работ сравнительно близких в тематике данной работы, было обнаружено достаточное количество работ, но, к сожалению, разнообразие тканей, диапазонов температур и условий экспериментов усложняет анализ представленных в этих исследованиях данных.

В связи с этим, было принято решение разделить найденные результаты на три блока работ различным по температурным диапазонам изучаемых в работах. Первый блок анализируемых статей, включает работы, в которых проводились эксперименты при температурах от комнатной до физиологической. Второй – от физиологической и выше. Данные диапазоны были выбраны в связи с тем, что эксперименты первого блока работ (при комнатной температуре) не полностью отражают оптические свойства ткани, а второй блок отражает результаты изменения свойств ткани при повышении температуры при патологии, или при терапевтическом или хирургическом воздействии. В третий блок работ было решено включить работы, описывающие исследования на фантомах тканей и математических моделей тканей.

1.1 Исследования при температурах от комнатной до физиологической

В работе [20] изучалось влияние температуры на оптические свойства дермы и подкожного слоя человека в зависимости от длины волны ближнего инфракрасного диапазона в диапазоне от 25 до 40 °С. Измерения проводились *ex vivo* на образцах кожи, взятых с живота.

Результаты показали воспроизводимое влияние температуры на коэффициент транспортного рассеяния дермы и подкожного слоя в диапазоне длин волн 650–1000 нм. А именно увеличение транспортного коэффициента рассеяния для дермы и уменьшение для подкожного слоя.

Величина температурного изменения коэффициента рассеяния была больше для дермы, чем для подкожного слоя. Направление изменения рассеяния было различным для дермы и подкожного слоя, с уменьшением коэффициента рассеяния для подкожного слоя и увеличением для дермы с температурой. Абсолютная величина изменения коэффициента рассеяния также отличалась, демонстрируя большее изменение для дермы, чем подкожного слоя. Положительная зависимость коэффициента от температуры была так же обнаружена в исследовании Троя [21] на ткани предстательной железы собак (измерения проводились при температурах в диапазоне от 25 °С до 65 °С).

Авторы объясняют отрицательную зависимость коэффициента рассеяния от температуры для подкожного слоя тем, что основными рассеивающими компонентами подкожного слоя являются липиды в мембранах и вакуоли. Исследования показали, что липиды претерпевают фазовые изменения при определенных температурах, которые изменяют их ориентацию, подвижность и порядок упаковки. Таким образом, уменьшение коэффициента рассеяния, наблюдаемое экспериментально при повышении температуры, согласуется с увеличением текучести, которое, как известно, происходит в липидах при повышении температуры [22, 23].

Так же в исследовании были показаны несколько точек данных в стороне от общего кластера. Авторы объясняют, что это связано с подготовкой образца. Образцы подкожного слоя, как правило, труднее приготовить, и иногда под покровным стеклом содержались небольшие пузырьки воздуха. Повышенные температуры могли вызвать расширение захваченного воздуха или, возможно, дегазацию растворенного воздуха, что привело бы к большим ошибкам. Подкожная ткань также более подвержена деформациям при малых изменениях давления, что могло позволить тканям перемещаться внутри держателя образца, что было невозможно с кожными образцами.

В работе [24] изучались изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от температуры, начиная с 14 °С. Сравнивались результаты, полученные на спинной коже хомяка *in vivo* и склере и роговице энуклеированных свиных глаз *in vitro*, на предмет согласованности. Интенсивность флуоресценции уменьшалась при повышении температуры от 14 до 42 °С как *in vivo*, так и *in vitro* тканей. Форма линии спектральной интенсивности изменилась около 450 нм из-за поглощения тканью. Изменение флуоресценции не зависело от способа повышения температуры, активного или пассивного. Охлаждение ткани (от 37 до 14 °С) вызывало монотонное увеличение интенсивности флуоресценции вплоть до 14 °С.

Авторы в работе [25] исследовали влияние изменения температуры на коэффициент диффузного отражения кожи предплечий *in vivo* в диапазоне длин волн 590–950 нм при локальном нагреве. Коэффициент рассеяния кожи предплечий *in vivo* демонстрировал положительную связь с температурой от 22 до 42 °С. Эта зависимость была обратимой без видимой задержки. Тот же эффект наблюдался на свиной коже *ex vivo*. Положительную мгновенную зависимость коэффициента рассеяния от температуры можно объяснить изменением показателя преломления межклеточной жидкости. Коэффициент рассеяния подкожного жира свиной кожи показал отрицательную зависимость от температуры. Эта отрицательная зависимость может быть связана с изменением

липидной фазы в зависимости от температуры. Коэффициент поглощения *in vivo* также увеличивался с повышением температуры от 22 до 42 °С, но изменение не было обратимым после того, как температура достигла 40 °С. В работе [26] так же наблюдалась линейная зависимость коэффициента рассеяния от температуры для кожи предплечья человека при температуре от 22 до 38 °С.

В работе [27] была исследована температурная динамика полных, коллимированных, диффузных и рассеивающих потоков некогерентного полихроматического света, проходящего через образец жира *in vitro*. В ходе экспериментов авторы обнаружили резкую деградацию рассеивающих свойств образцов жира *in vitro* при температуре 25 ± 1 °С. Было показано, что интенсивность света, прошедшего через слой жира толщиной $1 \pm 0,1$ мм (суммарное пропускание), в диапазоне температур 5 °С ÷ 50 °С увеличивается в два раза (изменяется от 0,5 до 1). Интенсивность диффузной и рассеивающей составляющей светового сигнала, прошедшего через слой сала, в диапазоне температур 5 °С ÷ 50 °С снижается в 1,5 раза (изменяется от 1 до 0,65). Интенсивность коллимированной компоненты света, прошедшего через слой жира, в диапазоне температур 5 °С ÷ 50 °С возрастает в 2,8 раза (изменяется от 0,35 до 1).

Исследования, описанные выше, согласуются с полученными данными:

1. Интенсивность флуоресценции уменьшается при повышении температуры для кожи и других тканей, не содержащих липидов.
2. Интенсивность флуоресценции увеличивается для жировых тканей. Это объясняется увеличением текучести липидов, претерпевающих фазовые изменения при определенных температурах.

В диапазоне от комнатной до физиологической температуры изменения оптических свойств биотканей наиболее хорошо исследованы в ближней инфракрасной области. В этой области поглощение обусловлено, в основном, водой. Модификации спектров поглощения воды, обусловленные изменением

температуры, в ближней инфракрасной области хорошо исследованы и охарактеризованы [28, 29, 30].

Так же известно, что прохождение света через многослойные среды с разными коэффициентами рассеяния различается в зависимости от направления прохождения света. Однако при поиске исследований на данную тематику выяснилось, что экспериментальные данные, анализирующие такие различия, для биологических тканей практически отсутствуют. При регистрации спектров отражения от кожи, или люминесценции глубоко расположенных хромофоров или наночастиц надо учитывать разницу в прохождении света внутрь и наружу.

1.2 Исследования при температурах от физиологической и выше

Зависимость поглощения гемоглобина от температуры исследовалась в работе [31]. Концентрат эритроцитов нагревали на водяной бане, гемолизировали дистиллированной водой и центрифугировали перед снятием спектров поглощения. Измерения проводились в диапазоне от 50 до 80 °С. Поглощение гемоглобина демонстрирует характерное изменение при нагревании. Это изменение частично обусловлено окислительными реакциями с образованием метгемоглобина, а также денатурацией белка. Показано, что тепловые изменения оптических свойств гемоглобина происходят при температурах выше 65 °С. При температуре выше 75 °С эта реакция протекает почти мгновенно. Образование метгемоглобина приводит к повышенному оптическому поглощению.

В работе [32] представлено исследование изменения оптических свойств опухоли крысы, легированной наночастицами золота, после лазерно-индуцированной плазмонно-резонансной фототермической обработки. Результаты эксперимента показали, несмотря на достаточно высокую температуру на поверхности, изменения в центре опухоли незначительны. В результате температура поверхности кожи над опухолью повышалась в области облучения за счет нагрева плазмонных наночастиц, поглощающих излучение.

Кинетика изменения температуры показывает, что за 7 минут температура увеличилась в 2,6 раза.

Основной целью исследования [7] являлось установление корреляции между изменениями оптических свойств тканей свиной и куриной грудной мышцы и состоянием коагуляции/повреждения этих тканей при нагревании тканей *ex vivo*.

В результатах первого эксперимента говорится, что коэффициент рассеяния тканей свиной увеличился по сравнению с исходным (между 49 °С и 63 °С) и начал уменьшаться при более высоких температурах. Уменьшение могло быть частично связано с карбонизацией ткани. Соответственно, увеличение коэффициента поглощения образцов ткани свиной на 28,5 % по сравнению с исходным значением наблюдалось при 140,8 °С (самая высокая изучаемая температура в данном эксперименте), вероятно, из-за карбонизации ткани. Однако известно также, что усыхание ткани при термической денатурации увеличивает коэффициент поглощения [8].

Для образцов ткани куриной грудки коэффициент рассеяния увеличивался по сравнению с исходным значением (между 51 и 58 °С) и далее стабилизировался. Уменьшения коэффициента рассеяния при более высокой температуре не наблюдалось. Минимальная карбонизация тканей наблюдалась при температуре выше 60 °С. Увеличение коэффициента поглощения на 52,9 % по сравнению с исходным уровнем наблюдалось при 130 °С (самая высокая изучаемая температура в данном эксперименте).

Во втором эксперименте в реальном времени непрерывно регистрировали изменения коэффициента рассеяния и коэффициента поглощения свиных мышц во время нагревания до 70 °С. Для мышц свиной без соединительной ткани наблюдался резкий скачок коэффициента рассеяния на $11,7 \pm 3$ мин. Значение коэффициента поглощения постепенно увеличивалось на 44 ± 30 % и резко снижалось на $11,7 \pm 3$ мин. Соответствующая температура составила $48,9 \pm 1,28$ °С. Резкие изменения коэффициента рассеяния и коэффициента

поглощения могут быть связаны с быстрой трансформацией микроструктуры ткани вследствие термокоагуляции.

Исходный коэффициент рассеяния свиных мышц с соединительной тканью, в несколько раз выше, чем измеренные в первом эксперименте. Это могло быть связано с тем, что разрушение соединительной ткани обнажает мышечную ткань для воздействия волоконно-оптического зонда и улучшает контакт зонда с подлежащей тканью, что приводит к резкому изменению измеряемых оптических свойств. Соответствующая температура, при которой коэффициент рассеяния вышел на плато при непрерывном мониторинге свиных мышц (с соединительной тканью), составила $63,6 \pm 0,78$ °C. Плато, наблюдаемое в первом эксперименте *ex vivo* было при близких температурах ($68,7 \pm 1,7$ °C и $57,1 \pm 1,5$ °C соответственно). Расхождение в температурах плато могло быть связано с такими факторами, как различия в начальной температуре ткани, толщине ткани, температуре окружающей среды и тепловым параметрам ткани, таким как содержание воды, теплопроводность и так далее.

Аналогичные результаты были получены Томсеном [33], который наблюдал двукратное увеличение коэффициента поглощения и семикратное увеличение коэффициента рассеяния (при 594 и 634 нм) в миокарде крысы между 45–65 °C и 60–70 °C соответственно. В исследовании Томсена также наблюдалось плато коэффициента рассеяния при 65 °C (594 нм) и 70 °C (634 нм) соответственно.

Цель работы [34] состояла в том, чтобы соотнести изменения светорассеяния с ультраструктурными изменениями в ткани бычей печени и мышц в зависимости от температуры. Результаты показывают, что коэффициент транспортного рассеяния увеличивается в диапазоне от 40–43 °C до примерно 80 °C (максимальная температура в данном эксперименте) для обоих видов тканей. Изменения больше для более короткой длины волны 633 нм по сравнению с 810 нм так же в обоих случаях. Ткани печени показывают медленное непрерывное изменение, тогда как наклон для мышц более крутой. Коэффициенты поглощения для печени и мышц уменьшаются при более высоких

температурах (выше 50 °С). Как и для коэффициента рассеяния изменения наблюдается больше для длины волны 633 нм. Джейвент в своей работе [35] также сообщал об увеличении транспортного коэффициента рассеяния при температуре от 40 до 80 °С в тканях мышц и печени крупного рогатого скота.

Как видно во втором блоке найдено гораздо меньше экспериментов на тканях с большим количеством вариантов видов ткани, однако эти несколько исследований так же показали корреляцию в результатах. Увеличение значения коэффициентов поглощения и рассеяния с увеличением температуры примерно до 50–70 °С, и уменьшением для более высоких температур.

Таким образом, при высокотемпературном нагреве происходят изменения, выражающиеся в увеличении коэффициента рассеяния света при слабом изменении коэффициента поглощения. При этом изменения зависят от типа биологической ткани и вида животного [7]. Изменения коэффициента рассеяния объясняются трансформацией микроструктуры ткани вследствие термостимулированной коагуляции. Значительные изменения величины коэффициента поглощения возможны только при карбонизации ткани [30, 33]. Так же фазовые переходы липидов, вызванные температурой, могут значительно повлиять на рассеяние света в ткани, соответственно на динамику изменения оптических свойств биологических тканей влияет содержание в них жира.

1.3 Исследования при помощи физических и математических моделей биологических тканей

Другая значительная часть опубликованных данных на эту тему описывают результаты разработки математических моделей [36, 37, 38], [39, 40] или эксперименты на фантомах и других моделях тканей [41, 42].

В работе [40, 41] изучалось влияние температуры на оптические свойства биологической ткани на примере молока. Оптические свойства молока были измерены с помощью технологии оптической когерентной томографии (ОКТ) в

диапазоне температур 20–35 °С, и был получен логарифм сигнала ОКТ, затем были проанализированы правила изменения оптических свойств с температурой. Результаты показали, что с повышением температуры можно наблюдать явное увеличение коэффициента затухания.

Эксперимент на фантоме молочной железы из плечевой ткани свиньи (жир, кожа и мышцы) в работе [41] показал изменение свойств света, проходящего внутри биологической ткани, при повышении температуры от 20 до 40 °С, на что указывает значительное усиление фотонов, собираемых детектором в геометрии пропускания. Измерение рамановских (КР) сигналов в образцах ткани свиньи толщиной до 40 мм указывает на значительное увеличение сигнала в диапазоне от 1,3 до 2 раз, в зависимости от биологической изменчивости. Наблюдаемое усиление приписывают фазовым переходам липидов в биологических образцах. Это указывает на то, что: 1) эксперименты, проводимые на ткани при комнатной температуре, могут привести к недооценке сигналов, которые могут быть получены на глубине ткани *in vivo*; 2) что эксперименты при комнатной температуре можно модифицировать для увеличения пределов обнаружения путем повышения температуры интересующего материала.

Авторы в работе [39] разработали численную модель для расчета распределения температуры в материале, облученном лазерным лучом. Температурное поле рассчитывалось с помощью модели и измерялось экспериментально в биологической ткани, подвергшейся воздействию импульсов сильно поглощаемого лазерного излучения. Получено хорошее согласие между теоретическими и экспериментальными результатами. Алгоритм может использоваться для прогнозирования зоны абляции, а также границ поврежденной зоны в ткани. Разработанная модель может применяться для оптимизации условий облучения для проектирования лазерных хирургических инструментов, которые будут оптимизированы для лазерной резки с минимальным термическим повреждением.

В исследовании [36] посредством решения нестационарного уравнения теплопроводности было рассчитано пространственное распределение температуры в тканях серого вещества головного мозга по мере развития процессов лазерной гипертермии. Разработан алгоритм численного моделирования уравнения теплопроводности и определена динамика пространственного распределения температуры и параметры, характеризующие температурный и временной порог, а также объем фототермического повреждения для тканей серого вещества головного мозга по мере развития лазерноиндуцированной термокоагуляции. Установлены условия – температура и длительность взаимодействия, мощность и длина волны излучения для формирования области коагуляционного некроза определенного объема ткани. Обнаружено, что по мере развития процессов гипертермии длительность экспозиции лазерного облучения сокращается примерно на 15–20 % для средней и до 30 % для высокой стадии термокоагуляции, объем фототермического повреждения уменьшается, соответственно, на 30–40 % и 50–60 %, а характеристическое расстояние и область эффективного прогревания в 1.5–2 раза. При этом дополнительное увеличение экспозиции приводит к обугливанию биотканей. Анализ характера пространственного распределения температуры позволил предположить, что по мере развития процессов фотогипертермии за счет уплотнения структуры в биотканях формируется «экранирующий слой» с высоким уровнем поглощения и рассеяния, приводящий к аккумуляции тепла с образованием слоя нагара, препятствующего распространению лазерного излучения и нагреву более глубоких областей.

Математическая модель, описывающая процесс взаимодействия лазерного излучения с биологической структурой, состоящей из эмали и дентина, и позволяющая моделировать процессы лазерной обработки для различных типов лазера была разработана в работе [37]. Модель основана на конечно-разностном методе и учитывает анизотропию оптических и тепловых параметров биологических структур. Результаты моделирования хорошо согласуются с

экспериментальными данными и учитывают ряд важных факторов взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями, например сложную многослойную структуру биологических тканей, отражение лазерного излучения от поверхности и другие.

Авторы в работе [35] так же изучали процесс взаимодействия лазерного излучения с биологической тканью на математической модели. Модель представляет собой зуб, лазер воздействует на его верхнюю, коронковую часть, которая, как правило, и служит очагом образования кариеса. Далее полученная авторами математическая краевая задача решалась с помощью программного кода на языке Python. Согласно полученным результатам и их интерпретации авторы делают вывод, что быстрое нагревание пораженной области может быть действительно эффективным методом в борьбе с кариесом, потому что нагрев происходит в очень тонком слое, а значит, не происходит ни повреждения эмали, ни повреждения дентина.

В работе [39] теоретически изучалось влияние динамических изменений оптических свойств на распределение света и температуры. Цель данного исследования заключалась в разработке математической модели динамических оптических изменений при термической денатурации и компьютерной программы для моделирования этих эффектов для многомерной геометрии. Метод Монте-Карло позволил получить ткань с переменными оптическими свойствами в каждом месте ткани, что возникает из-за неоднородного распределения температуры в ткани. Результаты этого исследования показали, что наблюдалось увеличение наклона кривой температура-время в центре лазера и на поверхности. Так же авторы упоминают, необходимость учета нескольких моментов. Начальные и конечные значения альbedo рассеяния могут играть важную роль в степени и характере отклонения температурного отклика по сравнению с предположением о постоянстве свойства. Есть признаки того, что на анизотропию рассеяния может влиять нагревание ткани, что может изменить поведение. Особенно при высоких значениях альbedo тепловой отклик весьма чувствителен к

изменениям анизотропии рассеяния [43]. Вторым моментом, что обезвоживание может быть еще одним важным фактором изменения оптических свойств [44]. Изменение коэффициента поглощения при повышении температуры может быть не очень большим; некоторые дебаты по этому поводу продолжаются. Наконец, в некоторых тканях рассеяние фактически может быть уменьшено, а не увеличено, что приведет к усилению передачи и совершенно иному температурно-временному поведению и прогрессированию термического повреждения в тканях.

Многие работы, основанные на методах математического моделирования и экспериментах на фантомах и моделях тканей, хоть и хорошо коррелируются с экспериментальными данными, но, к сожалению, полагаться на них в полной мере не целесообразно. Обзор литературных данных представляющих натурные эксперименты показал, что опубликованные данные неполны. Информация о температурной зависимости оптических свойств ткани ограничена, а так же может быть некорректна, так как существуют факторы, мешающие получению точных результатов.

Исходя из вышесказанного, можно сделать несколько выводов:

1. На основе информации о распределении зависимости изменения оптических свойств от внутренней температуры биологических тканей можно развить и оптимизировать методы современной лазерной терапии и оптической диагностики.

2. Опубликованные исследования по данной тематике неполны, а диапазон исследований в представленных экспериментальных данных достаточно ограничен.

3. Исследования оптических характеристик биологических тканей при заданной температуре является достаточно сложной задачей, в связи с рядом факторов мешающих получению корректных экспериментальных результатов.

Следовательно, изучение температурных зависимостей оптических свойств биологических объектов, несомненно, являются перспективной и актуальной задачей.

В данной тематике не изучено множество вопросов и не учтено множество факторов, которые необходимо изучать для полноценного понимания и анализа данных о температурных зависимостях биологических тканей. Это откроет огромные перспективы к разработкам в области терапии и диагностики различных заболеваний и позволит на ранних этапах диагностировать и лечить множество болезней. Так же стоит учитывать, что влияние лазерного излучения на биологические ткани изучается не только в рамках медицины, но и в других областях, например в сельском хозяйстве, что позволит развитию технологий во многих областях жизни общества.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

1.1 Материалы

Представленное исследование было выполнено на белых половозрелых крысах линии Wistar. При проведении экспериментов на животных соблюдались принятые международные этические нормы [11]. Проводимые экспериментальные исследования были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» (протокол № 8 от 10.04.2018). Исследовались образцы биологических тканей, взятые от 20 крыс, размером 10x10x1 мм. Исследовались образцы тканей здоровых крыс: кожа с удаленной шерстью и жиром, мышечная ткань, подкожная жировая ткань. От каждой крысы брали по одному образцу каждого вида ткани. Образцы, взяты не позднее, чем через 1 час после смерти. Это объяснялось тем, что, как известно, спектральные свойства биологической ткани *post mortem* несколько изменяются с течением времени [45].

1.2 Влияние методики регистрации на получаемые температурные зависимости оптических характеристик биологических объектов

Одним из основных методов исследования спектральных характеристик биологических сред является спектроскопия с использованием интегрирующих сфер. Наиболее часто регистрируют спектры диффузного пропускания и полного отражения света, что позволяет рассчитать спектральные зависимости коэффициентов поглощения и транспортного коэффициента рассеяния. При добавлении третьего измерения, например спектра коллимированного пропускания, становится возможным рассчитать еще и спектральные зависимости фактора анизотропии и, следовательно, коэффициента рассеяния.

Однако данный метод в случае исследования биологических объектов имеет ряд особенностей, затрудняющих получение корректных результатов. В частности, для поддержания заданной температуры и устранения потерь влаги во время регистрации спектра, необходимо помещать объект между двумя стеклами. В данном случае, для получения корректных результатов, необходимо знание спектральных зависимостей показателей преломления стекол и самого объекта. Получение данных о показателе преломления биологического объекта само по себе является достаточно сложной экспериментальной задачей. Кроме того, показатель преломления зависит от температуры, соответственно, неизбежно возникают погрешности при использовании одних и тех же данных при разных температурах объекта.

Другим источником погрешности является непостоянство оптического контакта между стеклом и объектом. Неоднородность поверхности объекта приводит к тому, что коэффициент отражения границы стекло-биообъект непрерывно изменяется в течение примерно 30 минут вследствие деформации объекта и изменения степени его прилегания к стеклу. Причиной этого является деформация объекта и выделение межклеточной жидкости, заполняющей неоднородности.

При исследовании с использованием интегрирующей сферы температурных зависимостей спектров отражения и пропускания биологического образца возникает проблема поддержания заданной температуры в течение всего эксперимента. Это требует создания мобильных нагревательных устройств, совместимых с входными окнами сферы и не нарушающих работу прибора.

Следует отметить, что вызываемые нагревом ткани изменения оптических характеристик протекают в течение некоторого времени, поэтому временной фактор может оказывать существенное влияние на полученный результат.

При желании получения также спектров коллимированного пропускания дополнительно необходимо обеспечить совместимость используемых нагревательных устройств с установкой для регистрации спектров в данном

режиме. Однако исследование спектров коллимированного пропускания света может быть самостоятельной задачей с созданием отдельных экспериментальных установок с нагревателями.

Одним из методов исследования состояния глубоко расположенных областей биологического объекта является регистрация спектров люминесценции образцов, как собственной, так и обусловленной вводимыми люминофорами или наночастицами. Однако при этом следует учитывать, что регистрируемые спектры могут быть искажены вследствие рассеяния и репоглощения тканями, через которые проходит излучение [46].

Люминесценция *in vivo*, как правило, регистрируется с использованием оптических волокон и коллиматоров [46], то есть, в режиме достаточно близком к режиму регистрации коллимированного излучения. В результате, можно сделать вывод, что для учета искажений спектров люминесценции можно использовать спектры коллимированного пропускания.

В связи с этим наши исследования характеристик биологических тканей были направлены, в основном, на исследование коллимированного пропускания света через образец и рассчитываемого по нему коэффициента ослабления коллимированного излучения непосредственно при заданной температуре.

Такие исследования позволяют получить корректную статистику для температурных изменений, как оптических характеристик биологической ткани, так и измеряемого сигнала интенсивности люминесценции. Кроме того, в методике коррекции искажений спектров люминесценции, возникающих вследствие самопоглощения ее объектом, используются данные именно по коллимированному пропусканию [47].

2.3. Методика регистрации спектров

2.3.1 Методика регистрации спектров полного пропускания и диффузного отражения с интегрирующей сферой

Регистрация спектров полного пропускания и диффузного отражения мышечной ткани крысы проводилось в спектральном диапазоне 380–2000 нм на спектрофотометрах Perkin Elmer Lambda 950 (США) и Shimadzu UV-3600 (Япония) с интегрирующей сферой.

В связи с вышеизложенным, эксперименты по выявлению температурных изменений спектральных зависимостей коэффициентов поглощения, рассеяния и фактора анизотропии проводились нами по двум алгоритмам:

1) Биологические ткани нагревались при заданной температуре, охлаждались до комнатной температуры, после чего последовательно регистрировались спектры полного пропускания, диффузного отражения и коллимированного пропускания [48, 49]. При этом не достигается получения спектральных зависимостей при заданной температуре – при охлаждении образца его характеристики изменяются, однако можно отследить вызванные температурой их изменения. Данный метод использовался нами при исследованиях результатов нагрева образцов до высоких температур, вплоть до 70 °С. Помещение нагревателя с такой температурой непосредственно в спектральный прибор может привести к выходу прибора из строя.

2) Все измерения проводились при заданной температуре, которая поддерживалась постоянной при помощи специально разработанного столика с подогревателем. Этот метод использовался при более низких температурах. Регистрация спектров проводилась при 25 °С (комнатная температура) и 38-39 °С (физиологическая температура). Известно, что нормальная температура тела крысы составляет 38,3 - 39,3 °С [50, 51]. Нами устанавливалась температура

39 °С, но, во время эксперимента она могла меняться в диапазоне 38-39 °С из-за некоторой нестабильности нагрева.

Образцы биотканей помещались между двух предметных стекол в прямоугольную пластину с центральным отверстием размером 10x10 мм. Толщина пластины составляла 1 мм, что позволяло фиксировать толщину образца между стеклами. На регистрацию всех данных для одного образца в одной его точке и при одной температуре тратилось время порядка часа. Дополнительно еще 30 минут тратилось на нагрев образца до нужной температуры – быстрый нагрев невозможен, потому что он приводит к коагуляции поверхностного слоя образца. Поэтому нами регистрировались спектры одного образца не более чем в трех точках.

Используя полученные спектры, а также спектры коллимированного пропускания, методика регистрации которых описана ниже, и программу IAD [52] для каждой измеренной точки образца были рассчитаны спектральные зависимости коэффициентов поглощения, транспортного коэффициента рассеяния и фактора анизотропии исследованных образцов. Затем полученные данные статистически обрабатывались при помощи программы Microcal Origin.

2.3.2 Методика регистрации спектров коллимированного пропускания

Для регистрации спектров коллимированного пропускания была использована установка, в которой часть оптического тракта, содержащая коллиматоры и исследуемый образец, была помещена в нагревательный шкаф с температурой, регулируемой с точностью до 0,1 °С. блок-схема которой приведена на Рисунке 2.1.

Регистрация коллимированного пропускания осуществлялась, как описано выше, при помощи спектрометра QE6500, Ocean Optics (США) в диапазоне 350–1000 нм. Данная установка позволяет также регистрацию спектров

люминесценции, сбор которой производится при помощи коллиматора, расположенного под углом 15° к нормали.

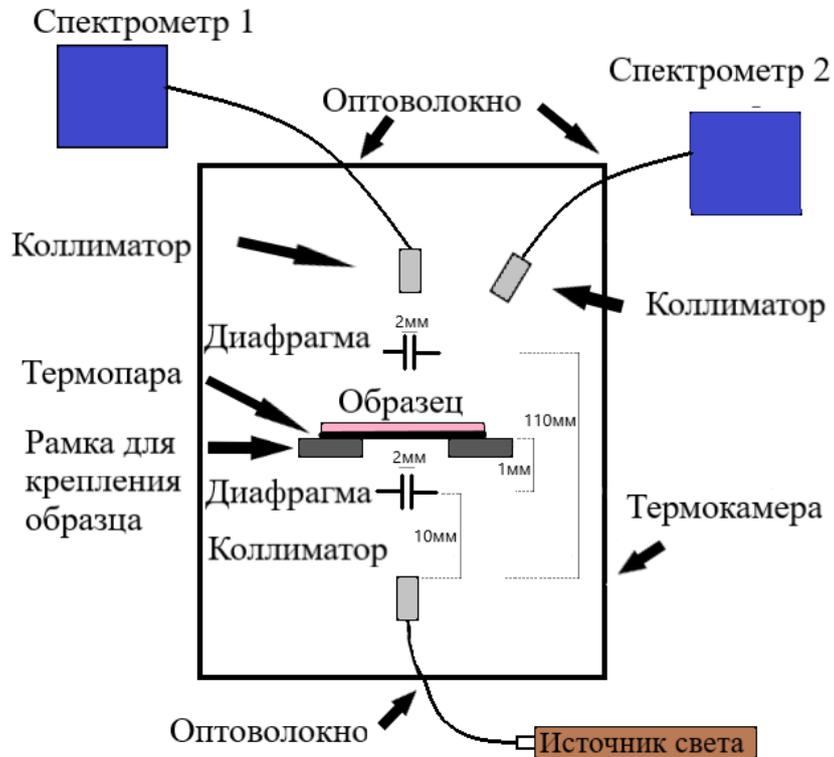


Рисунок 2.1 – Блок-схема установки для регистрации коллимированного пропускания

Для предотвращения искажений, вызванных отражениями на предметном стекле, образцы фиксировались на рамке без стекла. Образцы помещались в нагревательный шкаф и прогревались до заданной температуры постепенно (нагревательный шкаф имеет скорость нагрева около 1°C за 5 минут.). В шкаф помещались сразу все образцы для поддержания одинаковой температуры. На протяжении эксперимента образцы не вынимались из шкафа.

В шкафу поддерживалась насыщенная влажность для предотвращения высыхания образцов.

Регистрировалась серия спектров для каждого образца при начальной температуре (25,5 °С). Далее с шагом нагрева в 5 °С регистрировалась следующая серия спектров.

Спектры регистрировались в диапазоне температур 25,5–70 °С. Однако, стоит отметить, что при температурах от 50 °С и выше начинается сильная коагуляция белков ткани. Так же, при температурах от 50 °С и выше, несмотря на поддерживаемую влажность внутри шкафа, образцы начинают терять воду. При этом уменьшается толщина и вес, повышается прозрачность образцов.

Таким образом, в этой методике регистрации спектров учитываются и предотвращаются факторы мешающие анализу результатов, а именно искажение спектров, вызванное отражениями на предметном стекле, на которое помещается образец и изменение формы и свойств образцов из-за их высыхания.

Для выявления различий в спектрах люминесценции наночастиц, находящихся под слоем биологической ткани нами использовалась также установка, изображенная на Рисунке 2.2. В данной установке люминесценция собиралась при помощи широкоапертурной линзы.

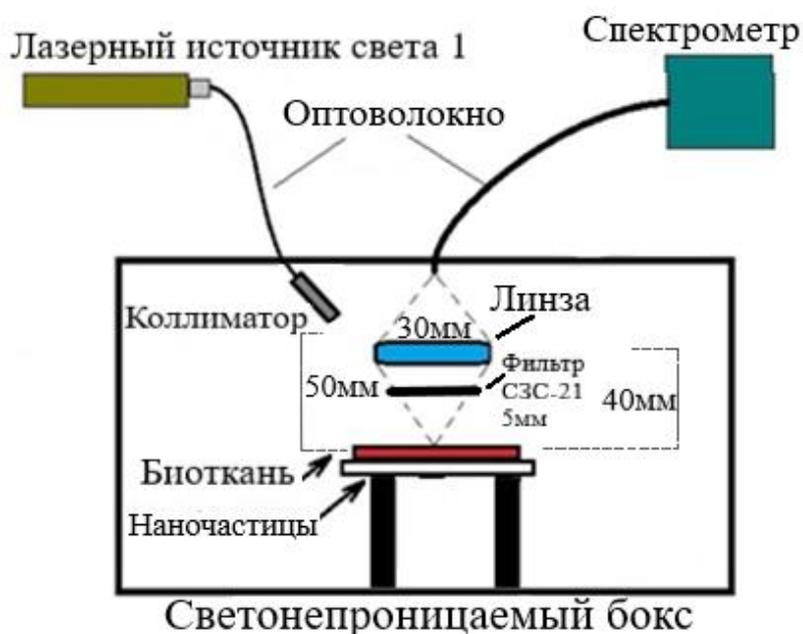


Рисунок 2.2 – Блок-схема установки для регистрации при широкоугольном сборе излучения люминесценции

ГЛАВА 3. ИЗМЕРЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ИНТЕГРИРУЮЩЕЙ СФЕРЫ

3.1 Различия оптических характеристик биологических объектов при комнатной и физиологической температурах

Так как опухоли, доступные для фототермического или фотодинамического воздействия расположены в приповерхностной области, основными объектами наших исследований были кожа, жировая и мышечная ткань.

В данном разделе показаны различия оптических свойств мышечной, жировой ткани и кожи крыс до и после нагрева образцов до физиологической температуры. Была проведена регистрация спектров коллимированного пропускания, полного пропускания и диффузного отражения мышечной ткани и кожи крысы. Регистрация спектров проводилась при 25 °С (комнатная температура) и 38-39 °С (физиологическая температура). Для каждой измеренной точки образца были рассчитаны спектральные зависимости коэффициентов поглощения, транспортного коэффициента рассеяния и фактора анизотропии исследованных образцов.

Результаты и обсуждение

Полученные в результате расчетов спектры представлены на Рисунках 3.1-3.10.

Как видно, из Рисунка 3.1 полученные спектральные зависимости коэффициентов поглощения мышечной ткани крысы коррелируют с литературными данными. Различия в амплитудах и положениях полос объясняются разницей в степени оксигенации гемоглобина. Очевидно, что основными источниками полос в спектрах являются полосы поглощения окисленной и восстановленной форм гемоглобина и воды. Из положения полосы Soret (410–416 нм) и формы α и β полос (575–579 и 540–544 нм) поглощения можно сделать вывод о преобладании окисленных форм гемоглобина. Известно [45], что после удаления ткани из живого организма ее свойства меняются.

Степень этих изменений зависит от химического состава ткани, техники приготовления и условий хранения. Полоса поглощения воды находится в области 970 нм. Изменения коэффициентов поглощения при повышении температуры находятся в пределах погрешности измерения и расчета, поэтому можно сделать вывод об отсутствии влияния температуры на поглощение.

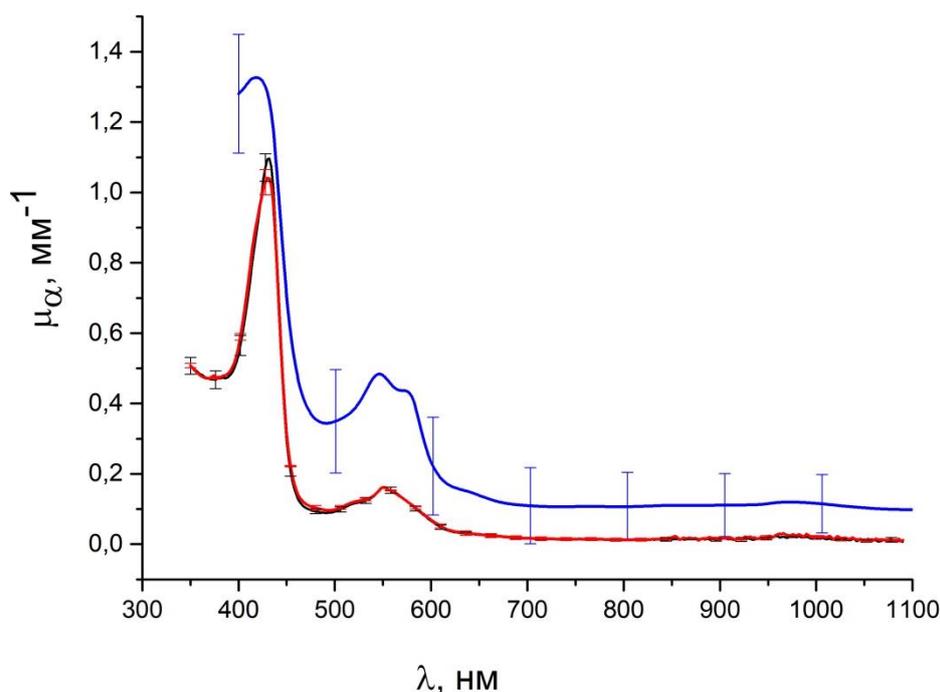


Рисунок 3.1 – Спектральные зависимости коэффициентов поглощения мышечной ткани крысы при 25 °C (черная линия), 39 °C (красная линия), литературные данные (синяя линия) [53]

При исследовании кожи регистрация спектров проводилась как при прохождении света со стороны эпидермиса, так и со стороны дермы. Как видно при сравнении Рисунков 3.2 и 3.3, при прохождении света через эпидермис коэффициент поглощения значительно растёт при увеличении температуры с комнатной до физиологической. Этот немаловажный факт стоит учитывать при проведении экспериментов на образцах кожи, поэтому в публикациях необходимо обязательно указывать геометрию прохождения света через образец, иначе приводимые данные не имеют практической значимости.

Различия в области полосы Соре в спектрах кожи, полученных при прохождении света с разных сторон образца можно объяснить тем, что сосудистые сплетения, содержащие эритроциты с гемоглобином в таких образцах находятся со стороны дермы. В результате, при прохождении света со стороны дермы, свет, проходящий через область, содержащую гемоглобин, является еще коллимированным. При прохождении со стороны эпидермиса свет, в результате прохождения через кожу, рассеивается, что приводит к изменению степени его поглощения гемоглобином.

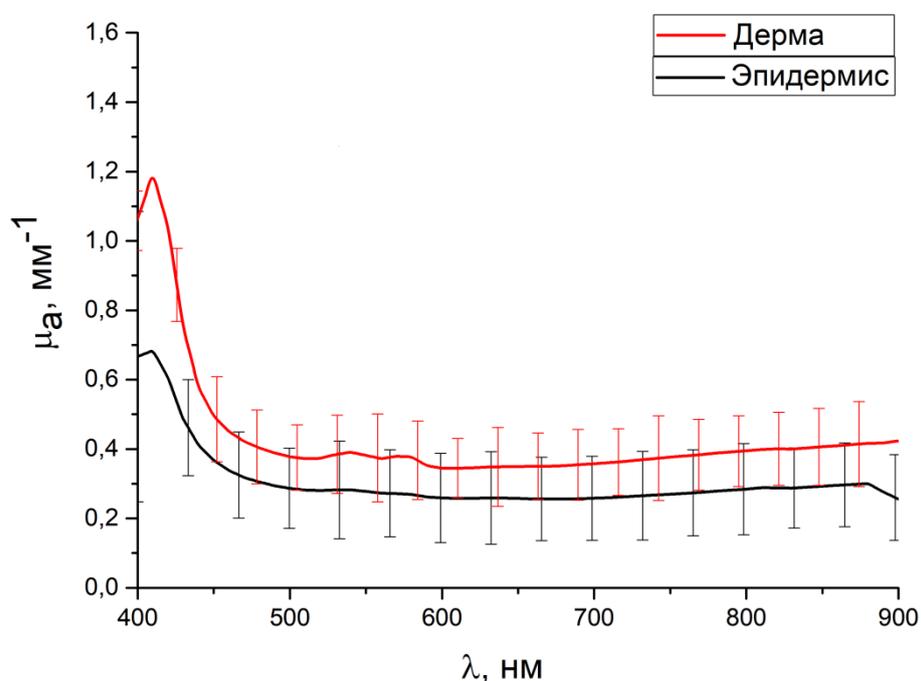


Рисунок 3.2 – Спектральные зависимости коэффициентов поглощения кожи крысы при 25 °С, полученные при прохождении света со стороны эпидермиса (черная линия) и дермы (красная линия). Формы спектров коррелирует с литературными данными, представленными в работе [54]

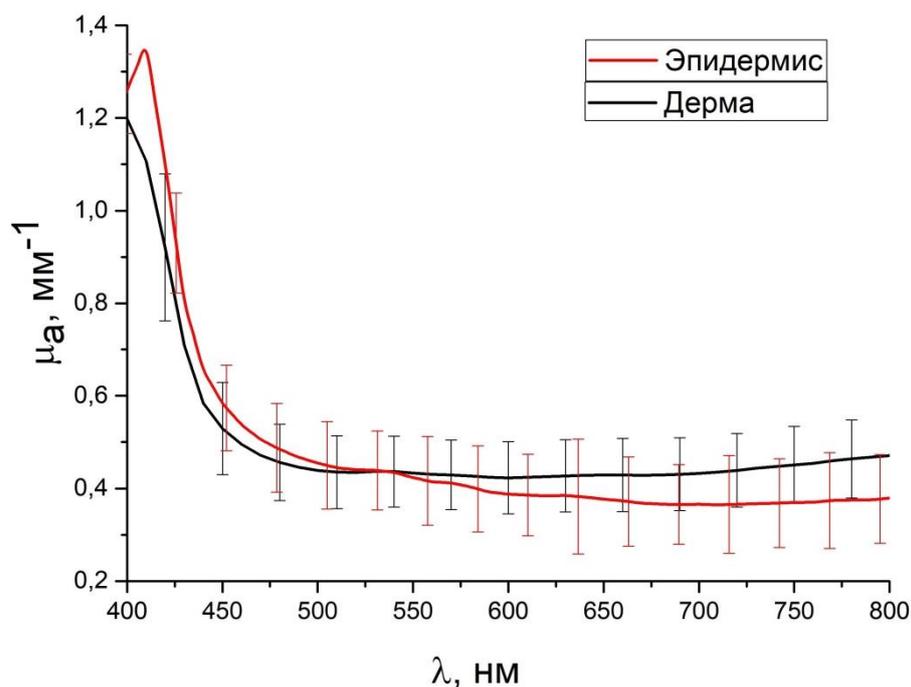


Рисунок 3.3 – Спектральные зависимости коэффициентов поглощения кожи крысы при 38 °С, полученные при прохождении света со стороны эпидермиса (черная линия) и дермы (красная линия). Формы спектров коррелирует с литературными данными, представленными в работе [54]

На Рисунке 3.4 приведены спектры коэффициентов поглощения жировой ткани крысы при 24 и 38 °С. Видно уменьшение поглощения при достижении физиологической температуры. Спектры жировой ткани представлены от 500 нм, так как неконтролируемое содержание гемоглобина в образце приводит к сильной погрешности в области полосы Сорэ. Форма спектров коррелирует с литературными данными.

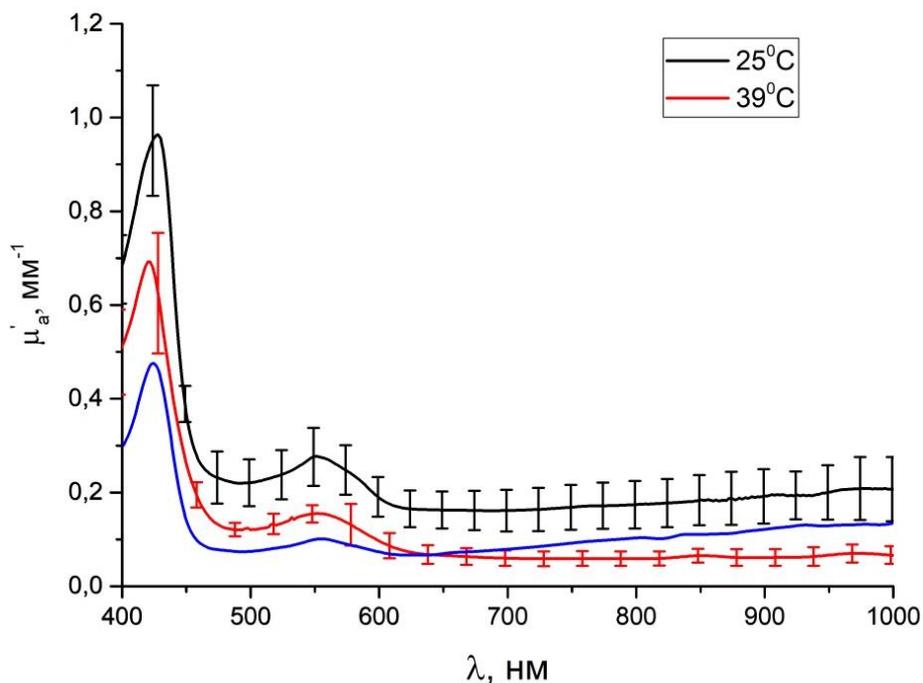


Рисунок 3.4 – Спектральные зависимости коэффициентов поглощения жировой ткани крысы при 24 °С (черная линия), 38 °С (красная линия), литературные данные (синяя линия) [55]

Транспортный коэффициент рассеяния (Рисунки 3.5, 3.6, 3.7) при переходе от комнатной к физиологической температуре достаточно сильно уменьшается для мышечной ткани, однако для жировой ткани и кожи изменения выражены меньше. Это сопровождается одновременным увеличением фактора анизотропии мышечной и жировой ткани (Рисунок 3.8, 3.9) и слабо изменяется для кожи (Рисунок 3.10). Такие изменения могут быть вызваны как изменением показателей преломления мышечных волокон и межклеточной жидкости, так и изменением вклада различных процессов рассеяния в общую картину.

Полученные спектральные зависимости факторов анизотропии приведены на Рисунках 3.8–3.10.

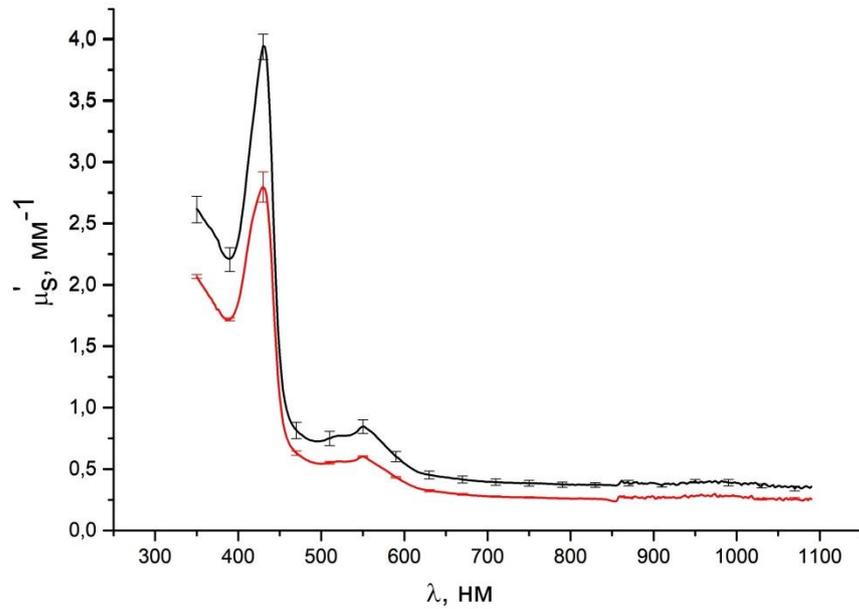


Рисунок 3.5 – Спектральные зависимости транспортных коэффициентов рассеяния мышечной ткани крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия). Формы спектров коррелирует с литературными данными, представленными в работе [53]

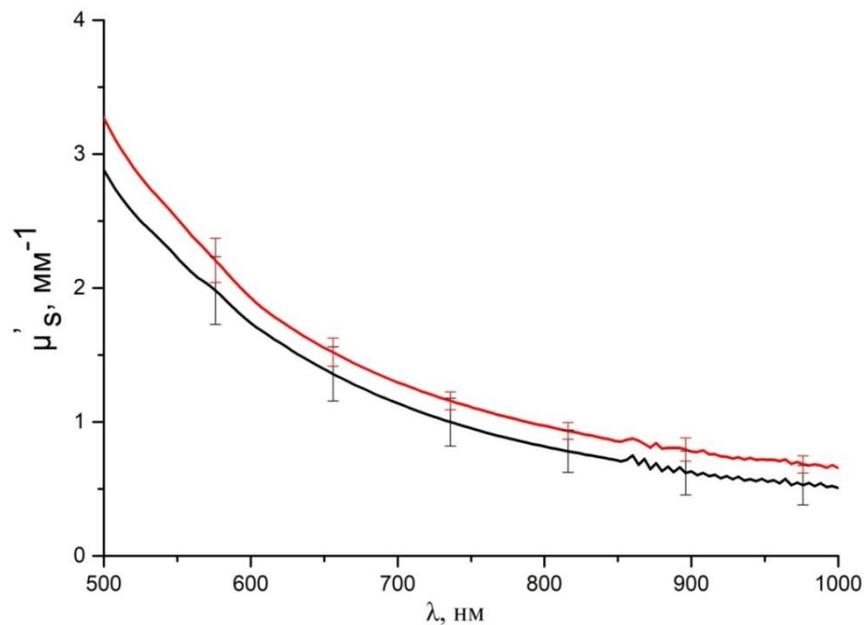


Рисунок 3.6 – Спектральные зависимости транспортных коэффициентов рассеяния кожи крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия). Формы спектров коррелирует с литературными данными, представленными в работах [54], [56]

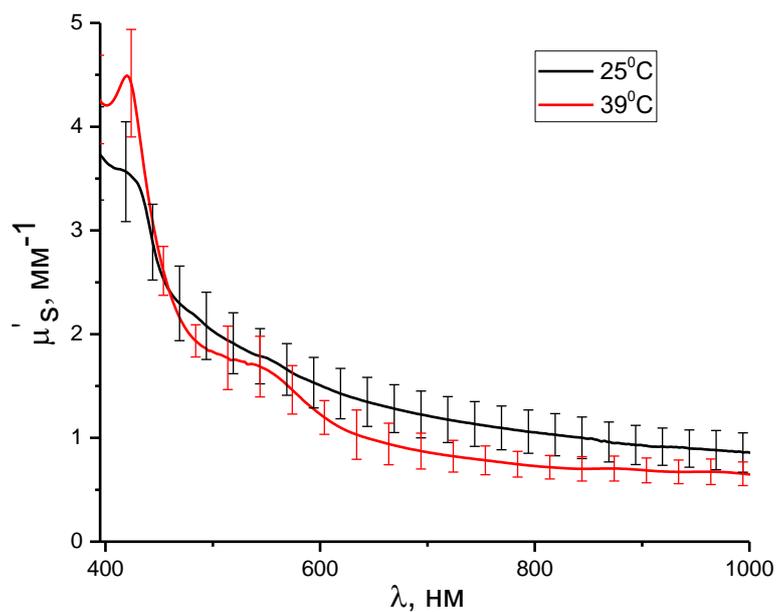


Рисунок 3.7 – Спектральные зависимости транспортных коэффициентов рассеяния жировой ткани крысы при 24 °С (черная линия) и 38 °С (красная линия). Формы спектров коррелирует с литературными данными, представленными в работе [54]

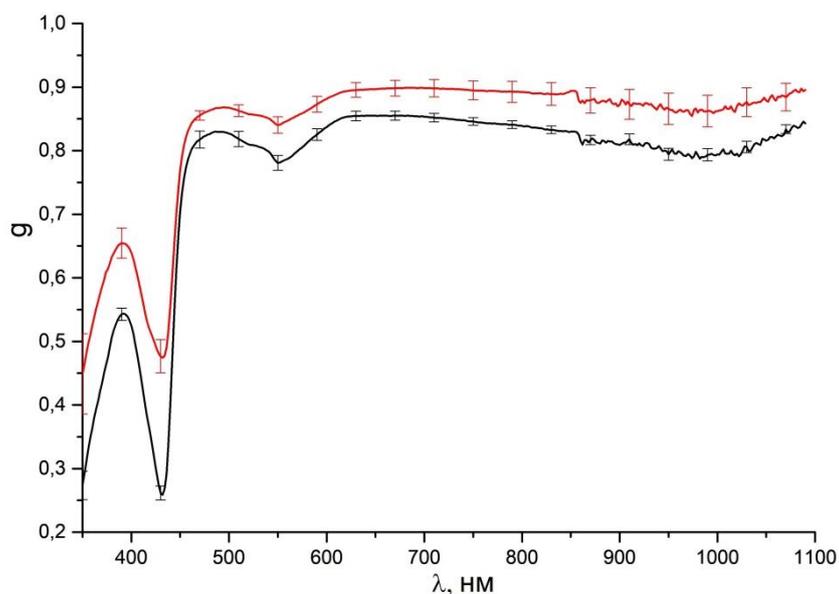


Рисунок 3.8 – Спектральные зависимости фактора анизотропии мышечной ткани крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия)

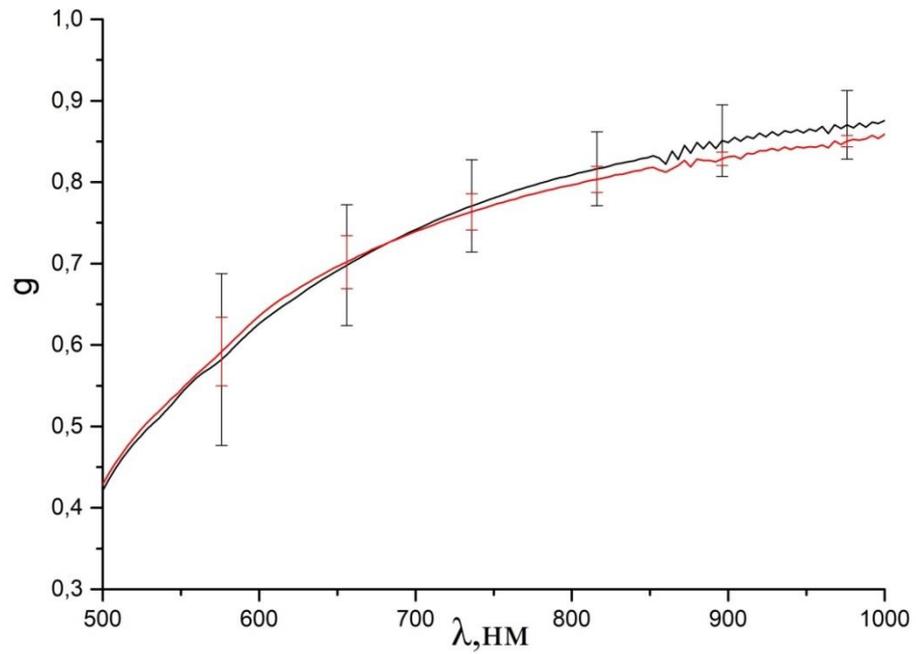


Рисунок 3.9 – Спектральные зависимости фактора анизотропии кожи (со стороны эпидермиса) крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия)

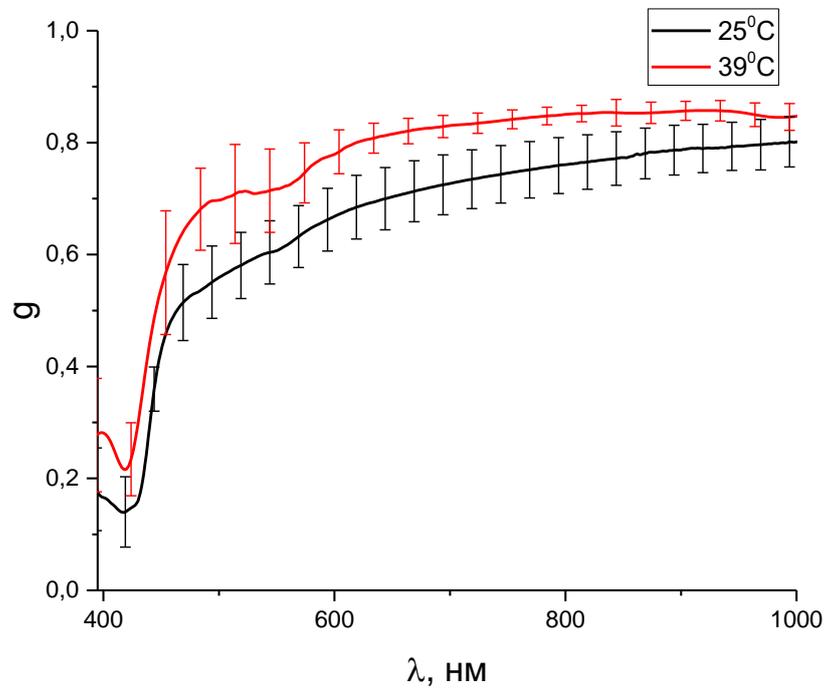


Рисунок 3.10 – Спектральные зависимости фактора анизотропии жировой ткани крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия)

Для выявления причин изменений нами рассчитаны спектральные зависимости коэффициентов рассеяния.

Коэффициент рассеяния света рассчитывался нами по стандартной формуле [46]:

$$\mu_s = \mu'_s / (1 - g) \quad (1)$$

Как показано на Рисунке 3.11, коэффициент рассеяния мышечной ткани изменяется значительно слабее, причем можно заметить рост коэффициента рассеяния в ближней инфракрасной области при повышении температуры. Ввиду малой вероятности изменения формы размеров рассеивателей, изменение коэффициента рассеяния может быть вызвано только изменением относительного показателя преломления. При увеличении длины волны увеличивается вклад рассеяния Ми на мышечных волокнах и уменьшается вклад рэлеевского рассеяния от надмолекулярных комплексов и клеточных органелл (ядра, митохондрии). Вследствие этого, наиболее вероятно, что увеличение коэффициента рассеяния в ближней инфракрасной области при нагреве обусловлено именно рассогласованием показателей преломления малых частиц и их окружения.

Однако это не объясняет поведение транспортного коэффициента рассеяния. Основной вклад в изменение транспортного коэффициента рассеяния, дает изменение фактора анизотропии, а именно, его увеличение при увеличении температуры. Такое увеличение анизотропии может быть обусловлено вкладом рассеяния Ми на анизотропных рассеивателях (фибриллах). В настоящее время не существует однозначного объяснения данного эффекта. Одним из предположений может быть изменение степени анизотропии вследствие температурных изменений относительного показателя преломления. Изменение показателя преломления воды более выражено, чем у белковых структур. Также возможны температурные изменения структуры и плотности фибрилл.

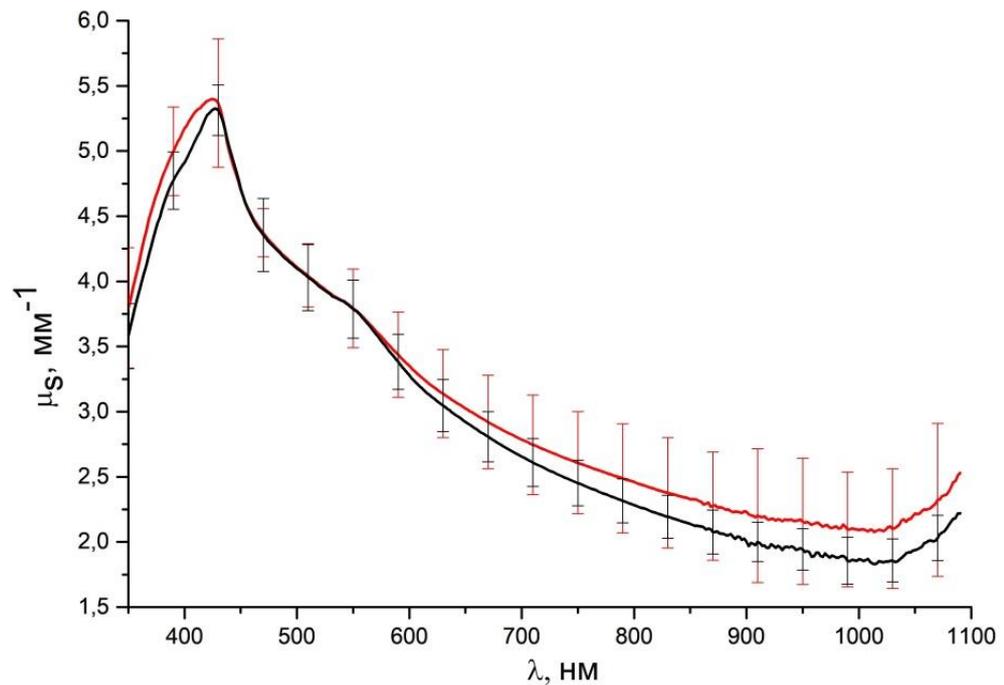


Рисунок 3.11 – Спектральные зависимости коэффициентов рассеяния мышечной ткани крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия)

Для кожи наблюдается обратная картина: фактор анизотропии изменяется слабо, в то время, как для коэффициента рассеяния различия очевидны (Рисунок 3.12). Для жировой ткани наблюдается увеличение коэффициента рассеяния и фактора анизотропии (Рисунок 3.13).

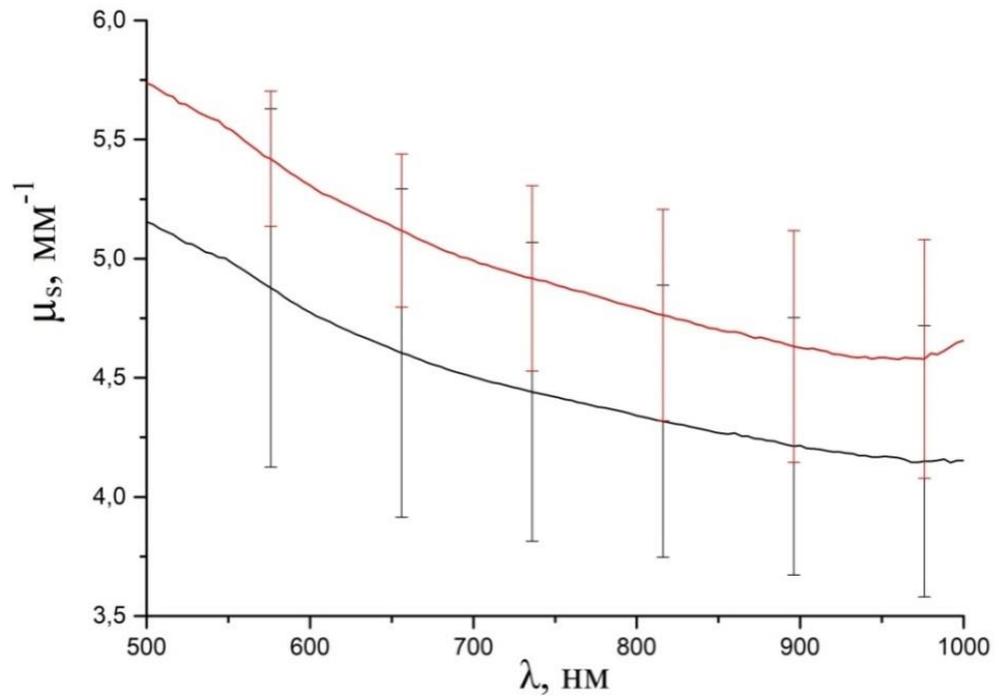


Рисунок 3.12 – Спектральные зависимости коэффициентов рассеяния кожи (со стороны эпидермиса) крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия)

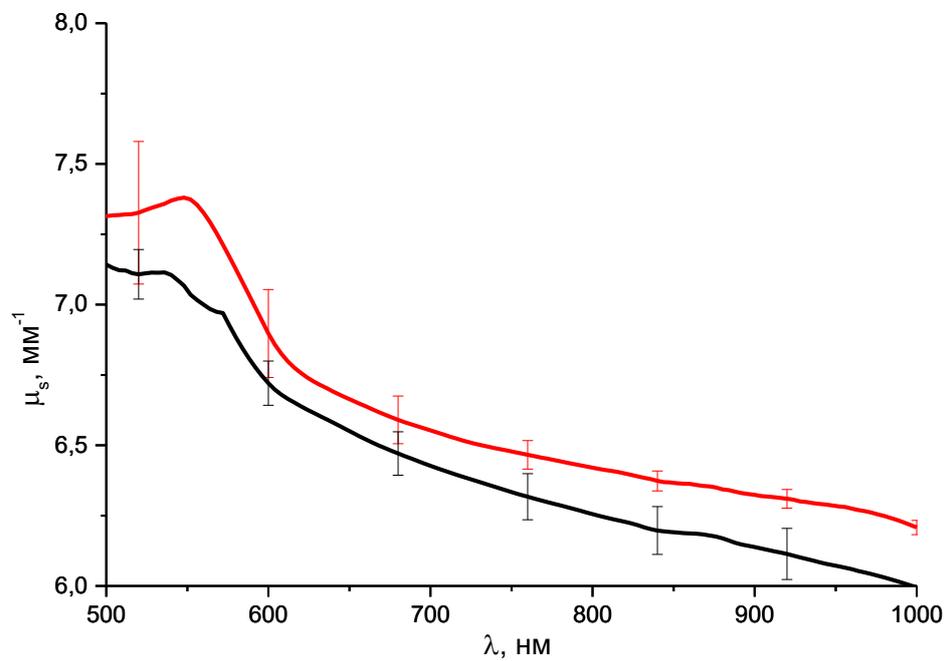


Рисунок 3.13 – Спектральные зависимости коэффициентов рассеяния жировой ткани крысы при 25 °С (черная линия) и 39 °С (красная линия)

Для выяснения влияния температуры на эффективность терапии или диагностики нами было рассчитано поглощение лазерного излучения по глубине биоткани. Расчет проводился методом Монте-Карло при помощи разработанной на кафедре программы. Для расчета выбраны две длины волны, часто используемые для терапии: 800 нм, используемая при лазерной термотерапии для возбуждения золотых плазмонных наночастиц, и 980 нм, используемая для возбуждения люминесценции апконверсионных наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$. При расчете использовались полученные нами значения коэффициента поглощения, транспортного коэффициента рассеяния и фактора анизотропии для температур 25 и 38 °С. Рассматривался плоскопараллельный образец, состоящий из слоев кожи крысы (1 мм), абдоминального жира (1 мм) и мышечной ткани (10 мм).

Результаты расчета приведены на Рисунках 3.14 – 3.15. По вертикали отоброжено количество поглощенных фотонов в относительных единицах.

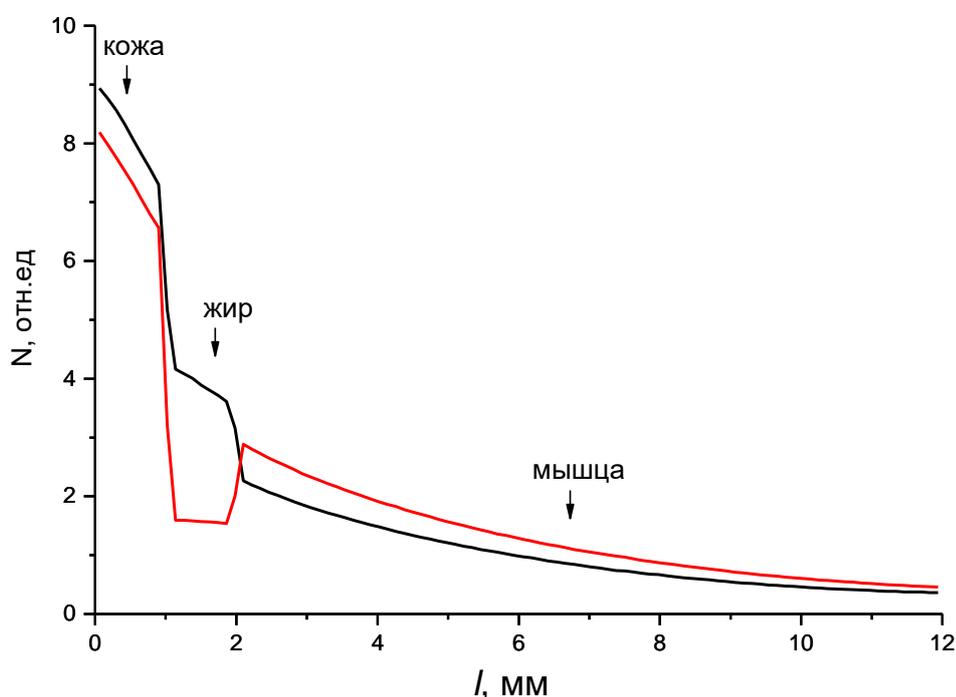


Рисунок 3.14 – Поглощение лазерного излучения с длиной волны 800 нм по глубине биоткани. Черная линия соответствует температуре образца 24 °С, красная 38 °С

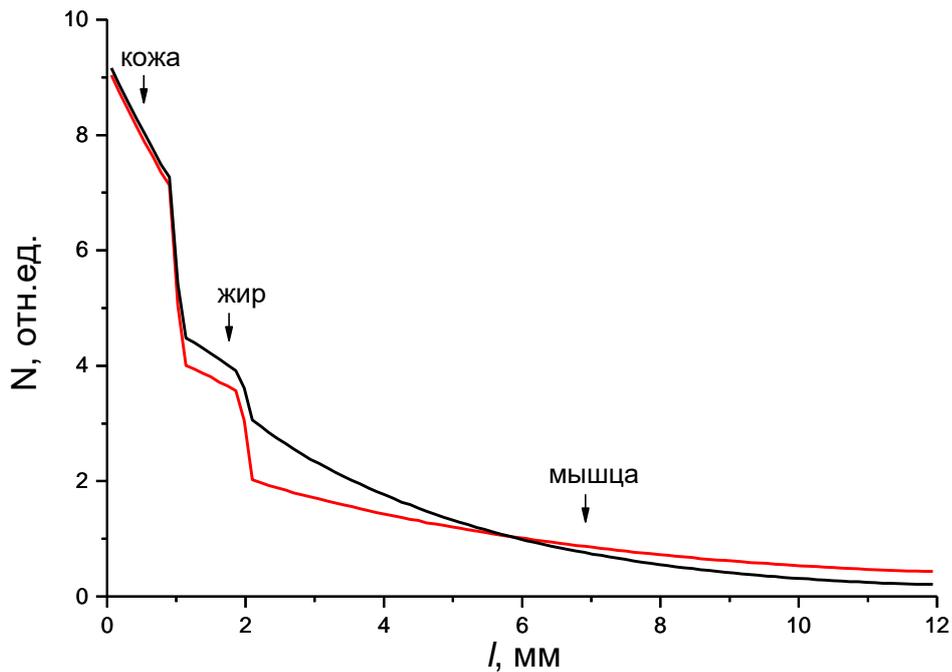


Рисунок 3.15 – Поглощение лазерного излучения с длиной волны 980 нм по глубине биоткани. Черная линия соответствует температуре образца 24 °C, красная 38 °C

Из рисунков следует, что изменение температуры от комнатной до физиологической приводит к видимым изменениям в поглощении излучения. При этом динамика поглощения по глубине для выбранных длин волн различается. Одной из возможных причин различия может быть разница в поглощении. На 800 нм поглощение минимально, в то время, как длина волны 980 нм попадает в полосу поглощения воды, что приводит к увеличению поглощения мышечной тканью. Просветление жировой ткани также уменьшает поглощение в ней.

Выводы

Показано, что оптические свойства мышечной ткани изменяются при нагревании и различаются для комнатной и физиологической температур. При этом коэффициенты поглощения и рассеяния практически не изменяются. Основным параметром, изменяющимся при изменении температуры, является

фактор анизотропии. Это изменение приводит также к изменению транспортного коэффициента рассеяния.

При изменении температуры кожи напротив, фактор анизотропии изменяется слабо в отличие от коэффициента рассеяния. Для жировой ткани наблюдается увеличение коэффициента рассеяния и фактора анизотропии. Такие изменения могут быть вызваны как изменением показателей преломления мышечных волокон и межклеточной жидкости, так и изменением вклада различных процессов рассеяния в общую картину.

Так же видно различие коэффициентов поглощения для кожи и жировой ткани. В полученных спектрах жировой ткани наблюдается уменьшение поглощения при достижении физиологической температуры. Из результатов, полученных при регистрации спектров кожи, следует, что при прохождении света через эпидемис и дерму наблюдается различие коэффициентов поглощения. При увеличении температуры с комнатной до физиологической значительно растёт коэффициент поглощения при регистрации света со стороны эпидермиса.

Знание оптических и термических свойств тканей человека необходимо для оптимизации лазерной терапии и оптической диагностики. Известно, что оптические свойства биотканей зависят от температуры даже в физиологическом диапазоне температур, то есть в диапазоне нормального функционирования организма. Тем не менее, большинство исследований проводятся при комнатной температуре образца или вовсе без указания температуры. Таким образом, несомненно, возникает вероятность того, что использование литературных данных приведет к некорректной оценке условий распространения света через биологическую ткань в живом объекте и могут привести к недостоверным результатам при медицинской оптической диагностике или терапии. Поэтому исследования температурных зависимостей оптических свойств биологических объектов, несомненно, являются актуальными.

Кроме того, при исследовании кожи необходимо учитывать геометрию прохождения света через образец, а именно, как проводится регистрация спектров

при прохождении света: со стороны дермы или эпидермиса. Этот немаловажный факт необходимо обязательно упоминать в публикациях, иначе эксперименты не имеют практической значимости.

Показано, что при прохождении лазерного излучения с длиной волны 800 нм, используемого для лазерной термотерапии, через такую многослойную среду, как кожа/жировая/мышечная ткань крысы изменение температуры от комнатной до физиологической приводит к уменьшению поглощения в коже и увеличению в мышечной ткани.

3.2 Изменения оптических характеристик кожи при сильном нагреве

В связи с невозможностью регистрировать спектры при повышенных температурах в приборе с интегрирующей сферой, нами регистрировались изменения после нагрева при фиксированной температуре в течение 60 мин в диапазоне 25–70°C.

Была проведена регистрация спектров полного пропускания и диффузного отражения образцов кожи до и после длительного (60 мин) прогрева при фиксированных температурах. Используя полученные данные, были рассчитаны спектральные зависимости коэффициентов поглощения и транспортного рассеяния образцов. Расчетные зависимости представлены на Рисунке 3.16–3.19. На Рисунке 3.18 представлена аппроксимация зависимости транспортного коэффициента рассеяния от длины волны степенным законом $\mu'_s = A\lambda^{-n}$ в диапазоне 500–800 нм. Исходные спектры полного пропускания и диффузного отражения измерялись при комнатной температуре.

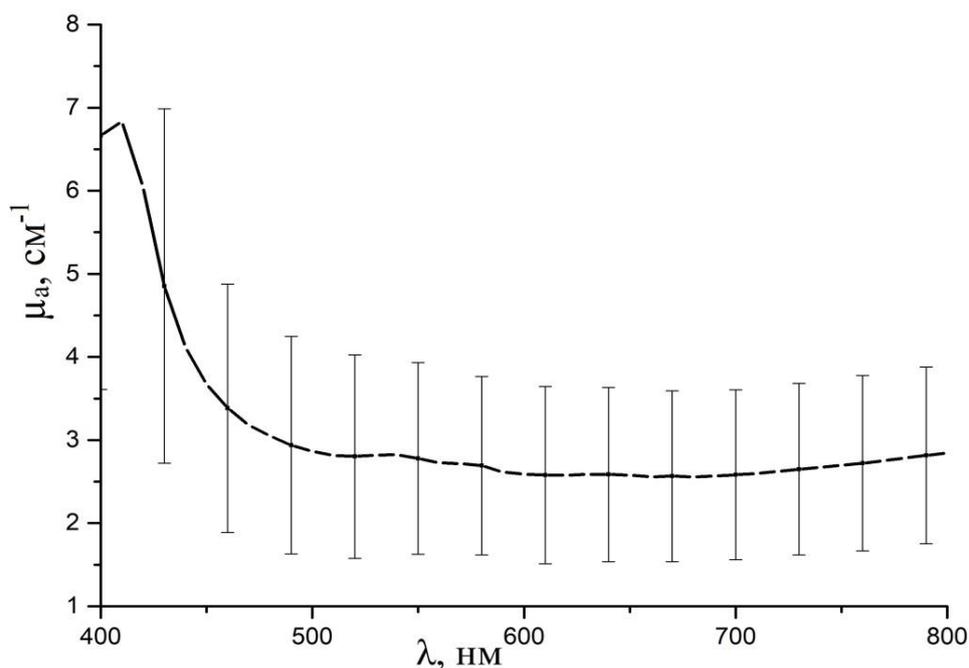


Рисунок 3.16 – Спектральная зависимость коэффициента поглощения образцов кожи до 60-минутного нагрева при фиксированной температуре при прохождении света со стороны эпидермиса

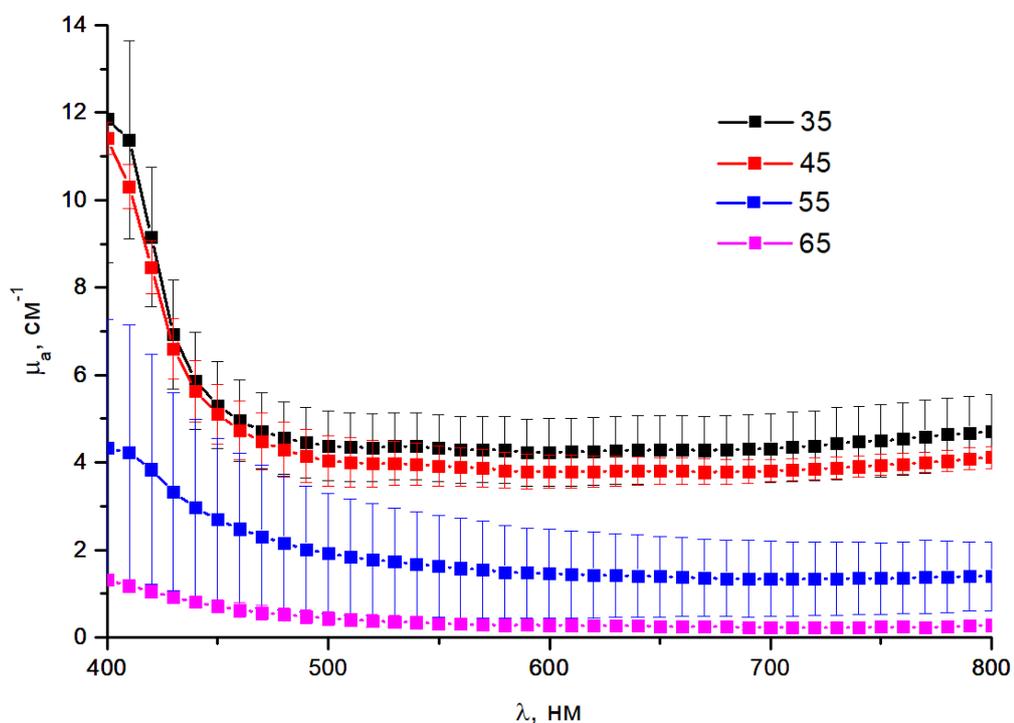


Рисунок 3.17 – Спектральная зависимость коэффициента поглощения образцов кожи после 60-минутного нагрева при фиксированной температуре при прохождении света со стороны эпидермиса

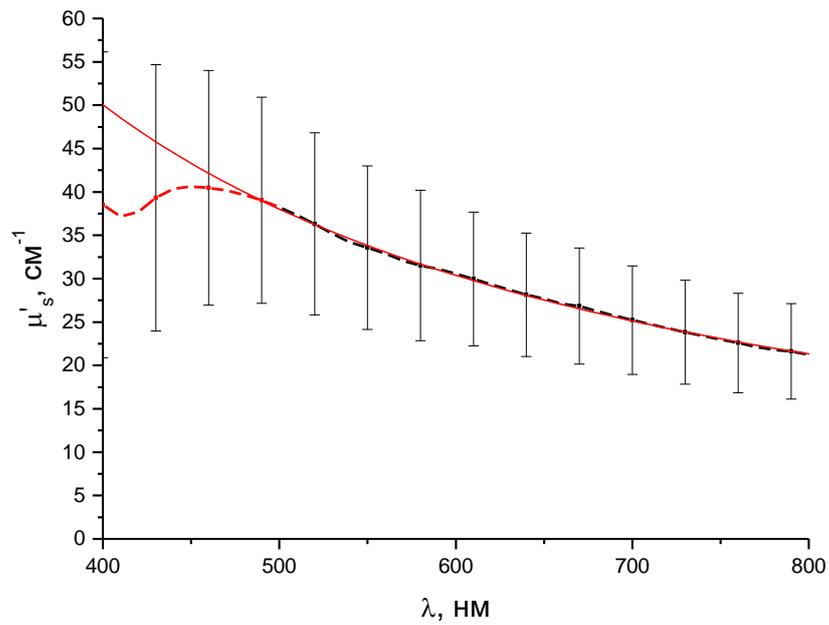


Рисунок 3.18 – Спектральная зависимость транспортного коэффициента рассеяния образцов кожи до 60-минутного нагрева при фиксированной температуре при прохождении света со стороны эпидермиса

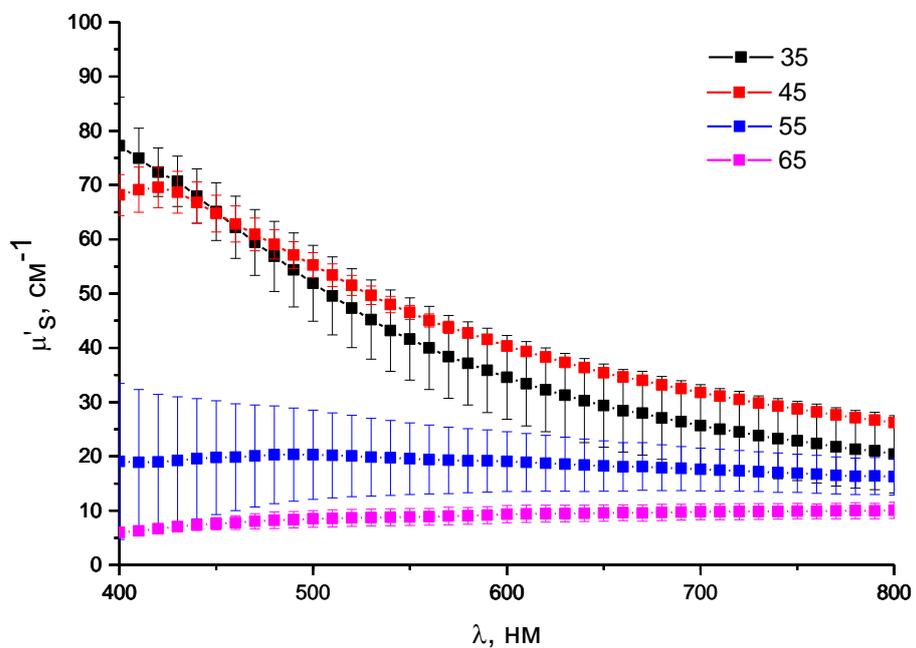


Рисунок 3.19 – Спектральная зависимость транспортного коэффициента рассеяния образцов кожи после 60-минутного нагрева при фиксированной температуре

В области биомедицинской оптики аппроксимация степенным законом $\mu'_s = A\lambda^{-n}$ широко используется для анализа спектральной зависимости транспортного коэффициента рассеяния биологических сред [57, 58, 59, 60]. Здесь A и n — безразмерные параметры. Параметр A комплексно зависит от концентрации центров рассеяния в биологической ткани и относительного показателя преломления и формирует общий уровень рассеяния. Показатель степени длины волны n характеризует средний размер рассеивателей биологической ткани и определяет спектральное поведение коэффициента μ'_s . Кроме того, показатель степени длины волны зависит от относительного показателя преломления рассеивателей. В соответствии с этой методикой была проведена аппроксимация полученных зависимостей.

Спектральные зависимости транспортного коэффициента рассеяния хорошо аппроксимируются степенным законом в диапазоне 500–800 нм. Пример аппроксимирующей кривой показан на Рисунке 3.18. Отклонение от аппроксимирующей кривой в области длин волн короче 500 нм объясняется влиянием полосы поглощения гемоглобина (полосы Core). Значения параметров аппроксимации приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Значения параметров аппроксимации

Температура, °C	A	n
35	2.33×10^6	2
45	1.19×10^5	1.61
55	39.4	0.47
65	0.097	-0.35
70	0.083	-0.37

Уменьшение показателя при длине волны указывает на увеличение размеров рассеивателей при нагревании. Поскольку коллагеновые волокна

являются рассеивателями в коже, можно сделать вывод, что такое увеличение обусловлено коагуляцией волокон. Очевидно, что нагрев даже при температуре 35 °С, не приводящий к коагуляции, приводит к изменению состояния волокон. Это подтверждается разницей между коэффициентами, приведенными в Таблице 1, и коэффициентами, рассчитанными для кожи, по спектрам, полученным при комнатной температуре ($A=8000$, $n=1,23$). Однако рассчитать размеры рассеивателей проблематично, так как, кроме размеров, показатель длины волны зависит от относительного показателя преломления волокон. Следует отметить, что резкое уменьшение коэффициента A при нагреве кожи нельзя объяснить только уменьшением концентрации рассеивателей. Этому снижению способствует изменение показателя преломления коллагеновых волокон при коагуляции, влияющее на изменение показателя длины волны.

Так же были получены спектры коэффициентов поглощения, транспортного рассеяния, а также коэффициентов рассеяния и фактора анизотропии кожи крысы при прохождении света со стороны эпидермиса, до и после 60-минутного прогрева при 60 °С. Спектры представлены на Рисунках 3.20–23. Содержание жира и гемоглобина в коже невелико, поэтому спектр определяется поглощением и рассеянием коллагена. Нагрев образцов кожи крыс приводит к изменению фактора анизотропии за счет коагуляции рассеивателей.

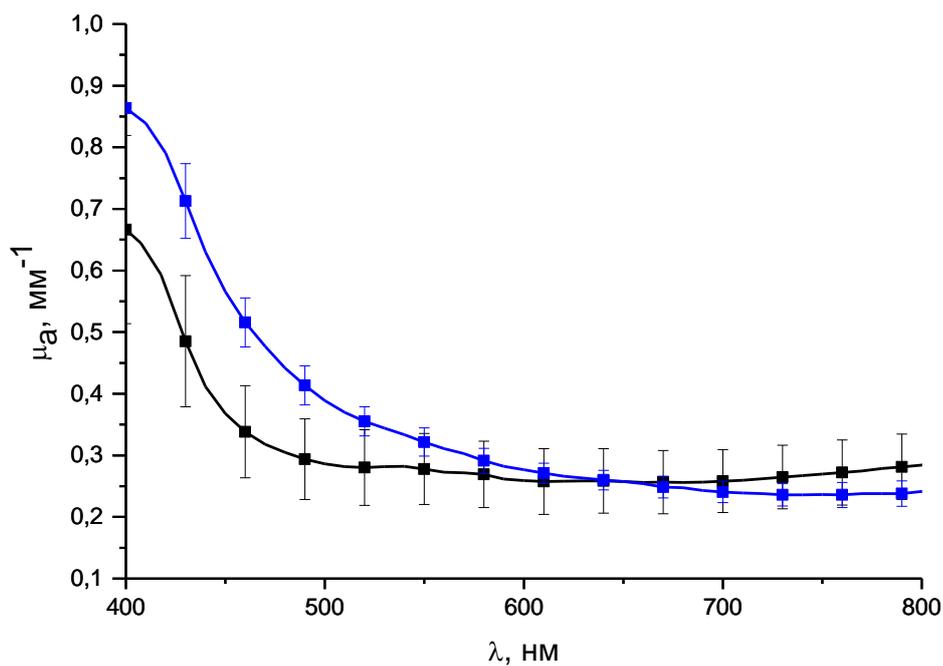


Рисунок 3.20 – Спектры коэффициентов поглощения кожи крысы до (черный) и после (синий) 60-минутного нагрева при 60 °С при прохождении света со стороны эпидермиса

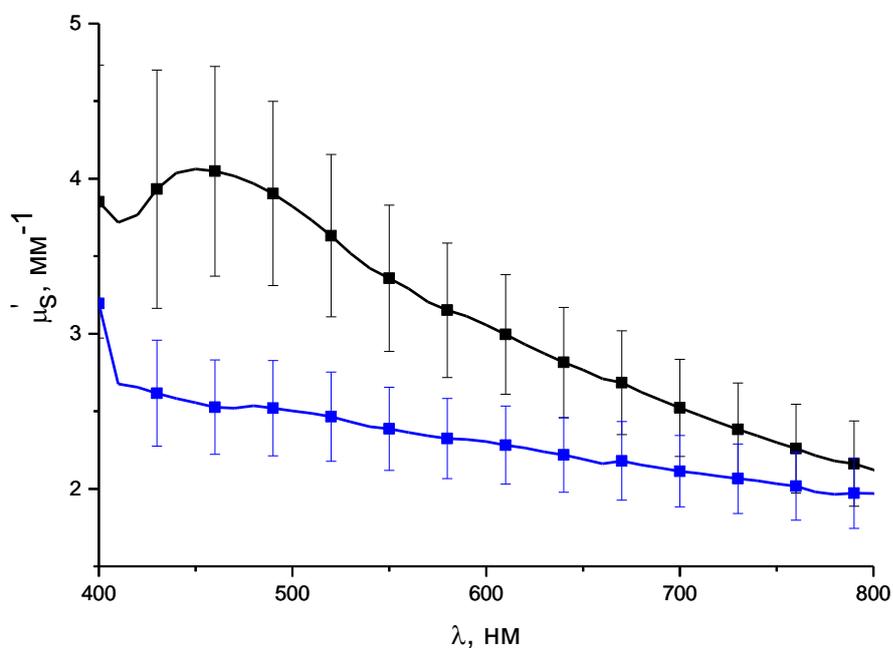


Рисунок 3.21 – Спектры транспортных коэффициентов рассеяния кожи крысы до (черный) и после (синий) 60-минутного нагрева при 60 °С при прохождении света со стороны эпидермиса

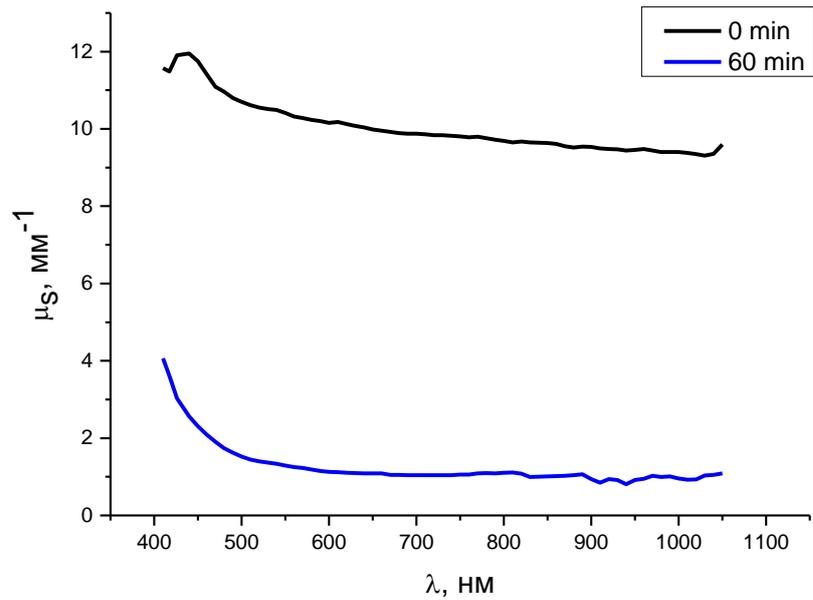


Рисунок 3.22 – Спектры коэффициентов рассеяния кожи крысы до (черный) и после (синий) 60-минутного нагревания при 60 °С при прохождении света со стороны эпидермиса

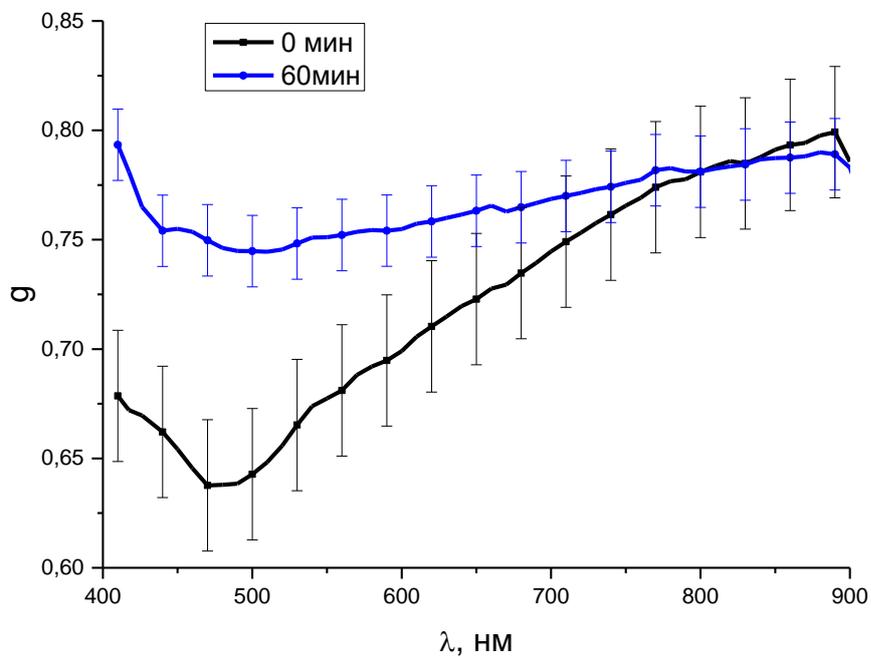


Рисунок 3.23 – Спектры фактора анизотропии кожи крысы до (черный) и после (синий) 60-минутного нагревания при 60 °С при прохождении света со стороны эпидермиса

Выводы

В результате исследований показано, что изменения спектральных характеристик кожи вызваны изменением светорассеяния в образце. Показано увеличение размеров рассеивателей при нагреве образцов, что приводит к изменению фактора анизотропии за счет коагуляции рассеивателей. Также сделан вывод об изменении показателя преломления коллагеновых волокон при нагревании.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЯ КОЛЛИМИРОВАННОГО ПРОПУСКАНИЯ СВЕТА БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ

Ранее нами были описаны исследования спектров кожи, мышечной и жировой ткани крысы при помощи интегрирующей сферы. При этом, для выявления температурных изменений, ткани нагревались при заданной температуре, после чего последовательно регистрировались спектры полного пропускания и диффузного отражения. На их основе рассчитывались коэффициенты поглощения и рассеяния объектов. Однако конструкция производимых в настоящее время спектрофотометров не позволяет проводить одновременно регистрацию обоих спектров. В то же время, регистрация ряда образцов в одном режиме, например, диффузного отражения, с последующим усреднением достаточно бессмысленна. Прохождение света через рассеивающую среду описывается транспортным уравнением и не подчиняется закону Бугера. Спектры пропускания и отражения данных объектов зависят как от их оптических параметров, так и от толщины. Толщина срезов биологических объектов неизбежно варьируется, в соответствии, с чем изменяются и спектры. Ввиду нелинейного характера зависимостей усредненный спектр для усредненной толщины образца не несет полезной информации.

В связи с этим исследования характеристик биологических тканей были направлены на исследование непосредственно при заданной температуре коллимированного пропускания и рассчитываемого по нему ослабления коллимированного излучения.

Такие исследования позволяют получить корректную статистику для температурных изменений измеряемого сигнала и, кроме того, в разработанной методике коррекции спектров люминесценции используются данные именно по коллимированному пропусканию.

4.1. Динамика изменений коэффициентов ослабления коллимированного излучения биологических объектов при ступенчатом повышении температуры

В данном разделе показаны различия оптических свойств мышечной ткани, кожи и жировой ткани крысы в зависимости от времени и температуры нагрева. Регистрация спектров проводилась при ступенчатом нагреве 25–70 °С без поддержания влажности и при ступенчатом нагреве 25–50 °С с поддержанием влажности. Температурные зависимости спектральных характеристик кожи, мышечной и жировой тканей крыс получены *in vitro*.

4.1.1 Без поддержания влажности

Исследовались изменения спектров коллимированного пропускания при ступенчатом повышении температуры в диапазоне 25–70 °С. По полученным спектрам рассчитывали спектральные зависимости коэффициента ослабления образца. По этим данным велась статистика. Примеры зависимостей показаны на Рисунке 4.1. Очевиден нелинейный характер изменений спектров, причем эти изменения различны для разных участков спектра. Наличие изобестической точки в районе 575 нм, вероятно, связано с совпадением показателей преломления рассеивателей и межклеточной жидкости, что приводит к уменьшению светорассеяния.

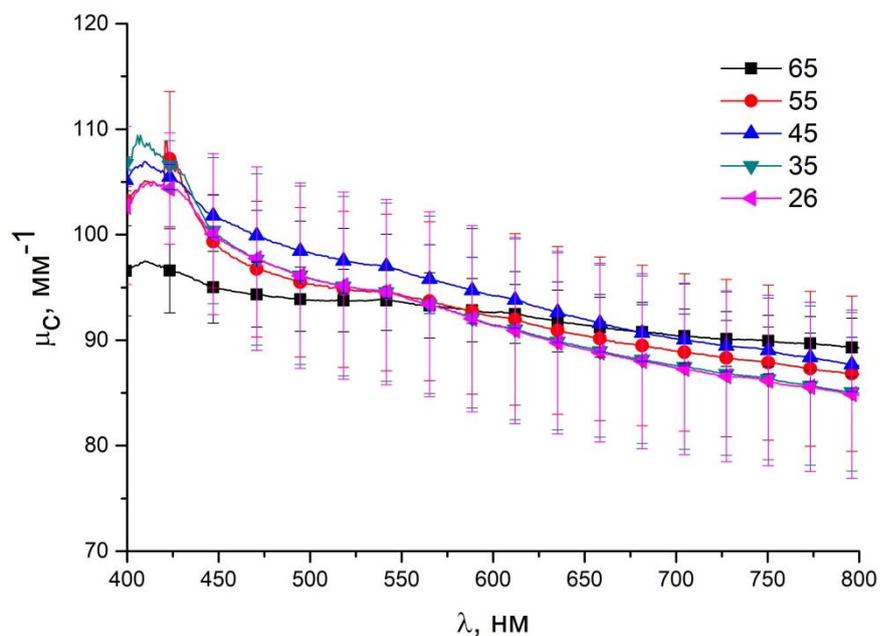


Рисунок 4.1 – Спектральные зависимости коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей, при достижении заданной температуры образца. На Рисунке показаны температуры в градусах Цельсия. Вертикальные линии показывают значения стандартного отклонения

Примеры зависимости коэффициента ослабления на фиксированных длинах волн от температуры нагрева образца приведены на Рисунке 4.2. Коэффициент ослабления незначительно изменяется в диапазоне 25–50 °С. В диапазоне 50–65 °С наблюдается увеличение коэффициента поглощения, обусловленное, по нашему мнению, изменением показателя преломления коллагеновых волокон. В интервале 65–70 °С коэффициент ослабления, наоборот, резко снижается. Наиболее вероятно, что это связано с увеличением размеров рассеивателей при коагуляции коллагена. Поведение коэффициента ослабления на длине волны 410 нм (максимум полосы Соре) иное, что должно быть связано с изменением состояния гемоглобина.

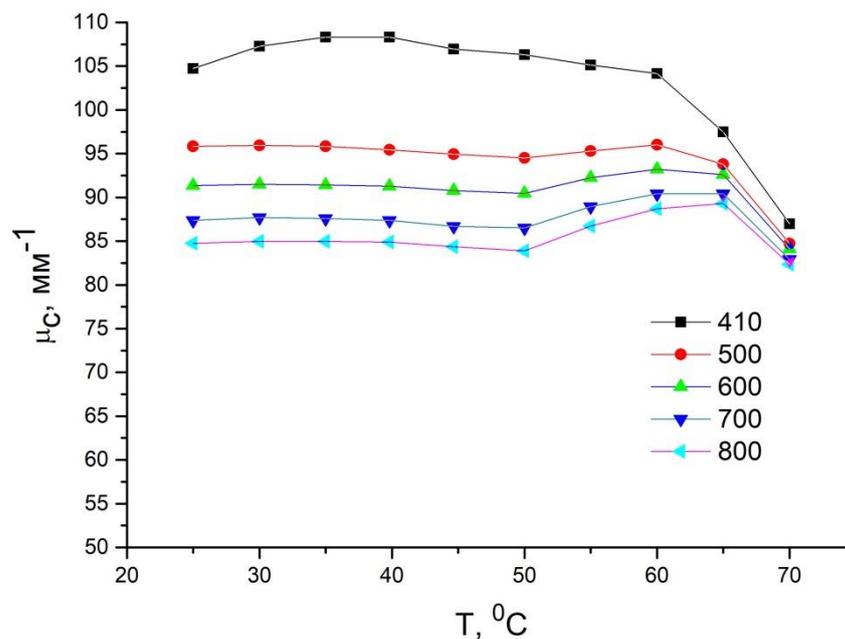


Рисунок 4.2 – Коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей на фиксированных длинах волн в зависимости от температуры нагрева образца. На Рисунке показаны длины волн в нанометрах

4.1.2 С поддержанием влажности

Проведены исследования спектров коллимированного пропускания образцов кожи, мышечной и подкожной жировой ткани крысы в условиях ступенчатого нагрева в диапазоне 35–50 °C, а также стабилизации влажности окружения (при насыщенном давлении паров воды).

На рисунках 4.3–4.6 приведены характерные спектры коэффициентов ослабления коллимированного излучения образцов.

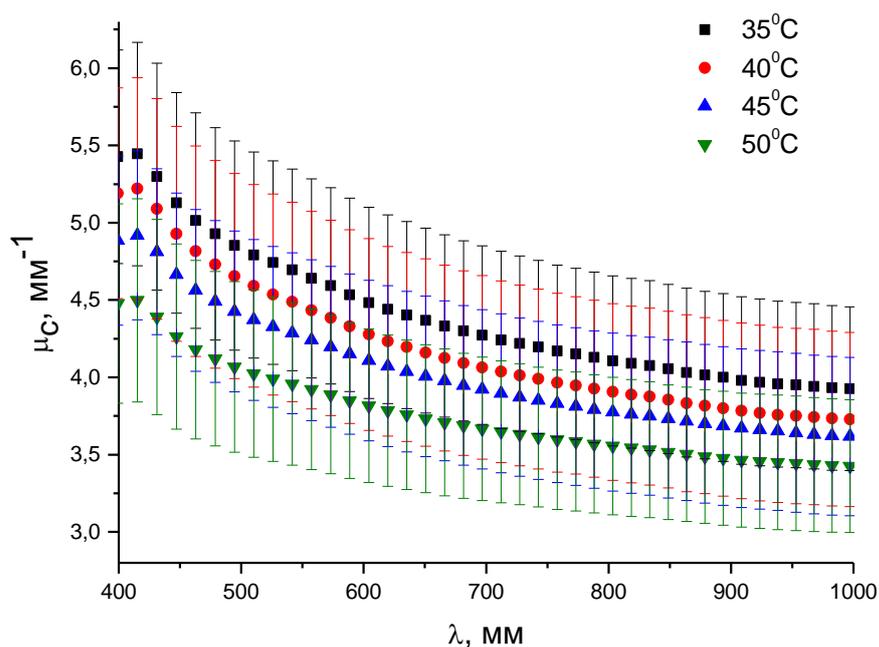


Рисунок 4.3 – Спектры коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей крысы при прохождении света со стороны эпидермиса

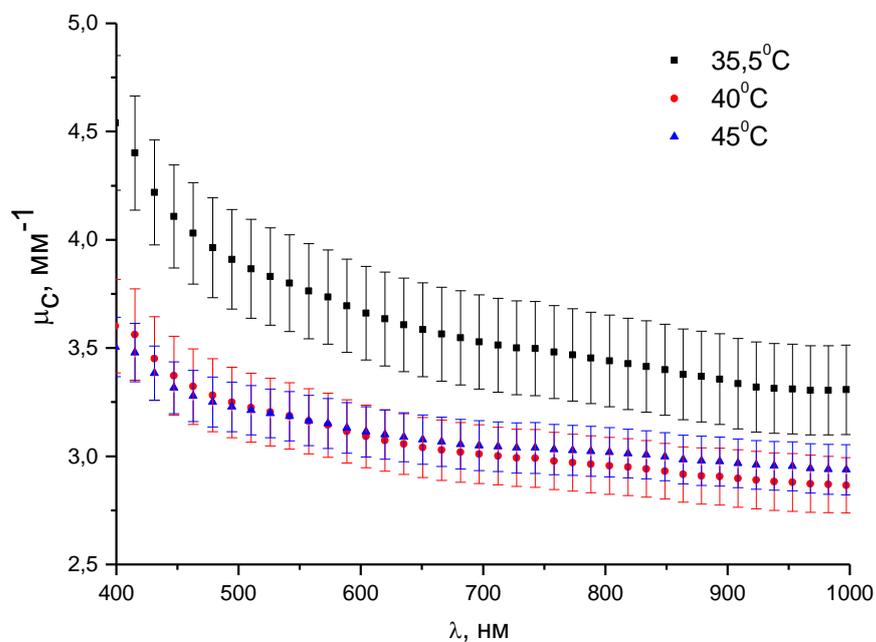


Рисунок 4.4 – Спектры коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей крысы при прохождении света со стороны дермы

Выявлено, что для кожи, как многослойной поглощающей и рассеивающей свет среды коэффициенты ослабления для излучения, проходящего извне (со стороны эпидермиса) и изнутри (со стороны дермы) различны. Это подтверждает результаты, полученные в Главе 3.1. При прохождении света со стороны дермы ослабление света меньше, что может быть связано с тем, что рассеяние света в эпидермисе выше, чем в дерме.

Следует отметить, что полученные результаты отличаются от полученных ранее, выполненных без поддержания влажности. Возможно, это связано с высыханием верхнего и нижнего слоев образца, вследствие чего увеличивается отражение и рассеяние света на них.

На Рисунке 4.5 представлены спектры мышечной ткани крысы, полученные при разных температурах. Полученные изменения можно связать с фазовыми переходами в жировой ткани, неизбежно присутствующей в образцах. Эти изменения согласуются с поведением спектров жировой ткани при разных температурах (Рисунок 4.6).

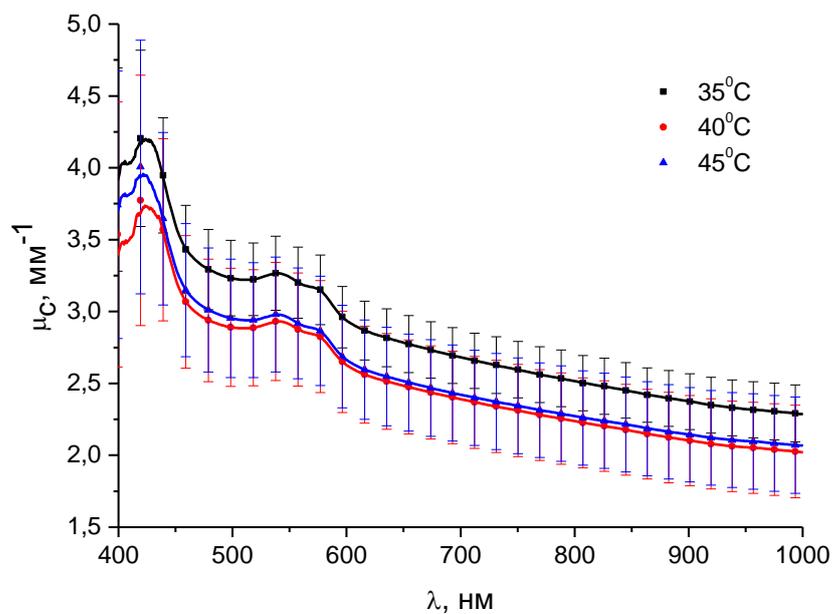


Рисунок 4.5 – Спектры коэффициента ослабления коллимированного излучения мышечной ткани крысы

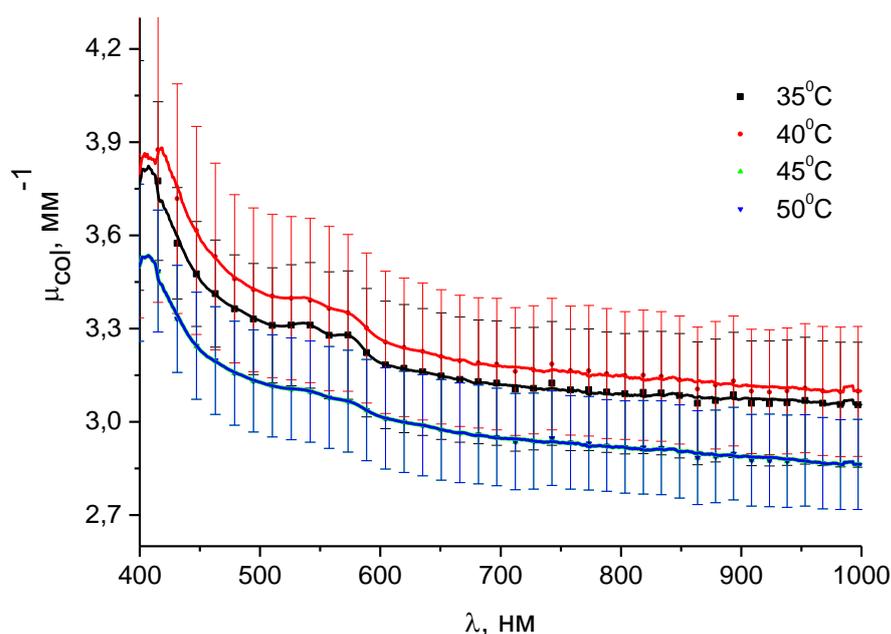


Рисунок 4.6 – Спектры коэффициента ослабления коллимированного излучения жировой ткани крысы

Выводы

Показано, что поддержание влажности позволяет исключить искажения спектров вследствие высыхания и повышенной коагуляции ткани при температурах вплоть до 45 °С.

Так же еще раз подтверждаются результаты, полученные в Главе 3: оптические характеристики кожи различаются при прохождении света со стороны дермы и со стороны эпидермиса. Показано, что при прохождении света через кожу со стороны дермы ослабление света меньше, чем со стороны эпидермиса. Это может быть связано с тем, что рассеяние света в эпидермисе выше, чем в дерме.

4.2 Динамика изменений коэффициентов ослабления коллимированного излучения биологических объектов, выдерживаемых при различных температурах

Спектры коэффициентов ослабления коллимированного излучения мышечной ткани крысы, полученные до и после 60-минутного нагревания при 60°C, представлены на Рисунке 4.7.

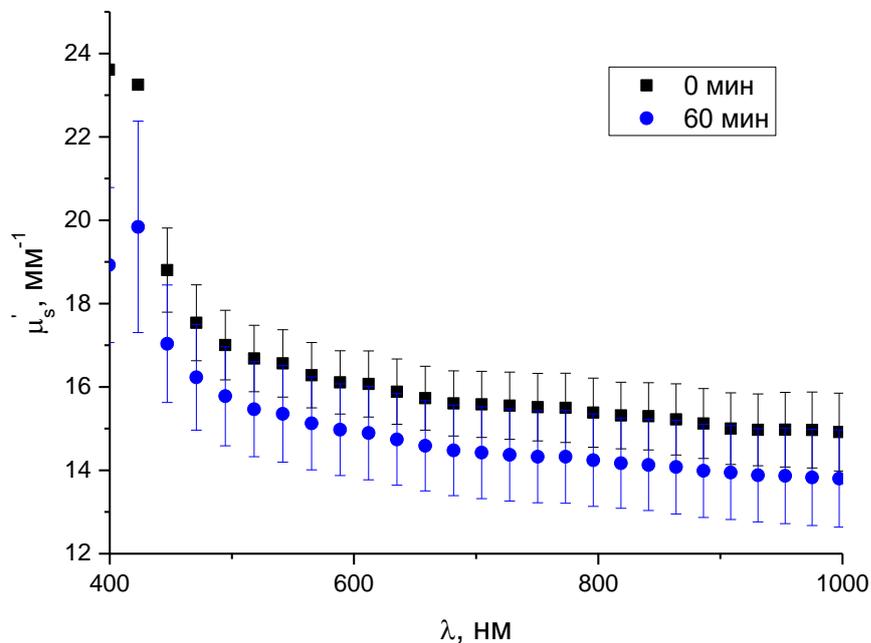


Рисунок 4.7 – Спектры коэффициента ослабления коллимированного излучения мышц крысы, полученные до (черный) и после (синий) 60-минутного нагревания при 60°C

Спектр поглощения преимущественно гемоглобина наложен на спектр рассеяния мышечной ткани. Нагревание изменяет структуру гемоглобина, что влияет на динамику поглощения. Количество жира в мышечной ткани минимально, поэтому влияние фазовых переходов в жире на динамику коэффициента поглощения мышечной ткани маловероятно.

При термотерапии ткани быстро нагреваются до заданной температуры, после чего температура сохраняется некоторое время. Поэтому мы измеряли коллиммированный коэффициент пропускания при нагреве образцов именно таким образом.

В качестве примера динамики изменения коллиммированного пропускания нами были использованы длины волн, применяемые в лазерной термотерапии: 800 нм — длина волны облучения нагретых золотых плазмонных наночастиц, 980 нм — длина волны возбуждения нанотермометров на основе ап-конверсионных наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, 545 нм — длина волны, соответствующая области регистрации люминесценции ап-конверсионных наночастиц, по которой рассчитывается температура образца.

На Рисунке 4.8 представлены временные зависимости коэффициента ослабления коллиммированного излучения мышечной ткани крысы, выдерживаемой при различных температурах. Коагуляция тканей отсутствует при нагревании образцов мышечной ткани до заданной температуры при температуре до 50 °С. При 70 °С нагрев приводит к увеличению поглощения. Скорость увеличения поглощения при выдержке при данной температуре увеличивается с повышением температуры. При этом коагуляция гемоглобина происходит быстрее, чем мышечной ткани. Последующее уменьшение поглощения, скорее всего, связано с изменением содержания воды в образце, что подтверждается более высокой скоростью изменения при длине волны 980 нм.

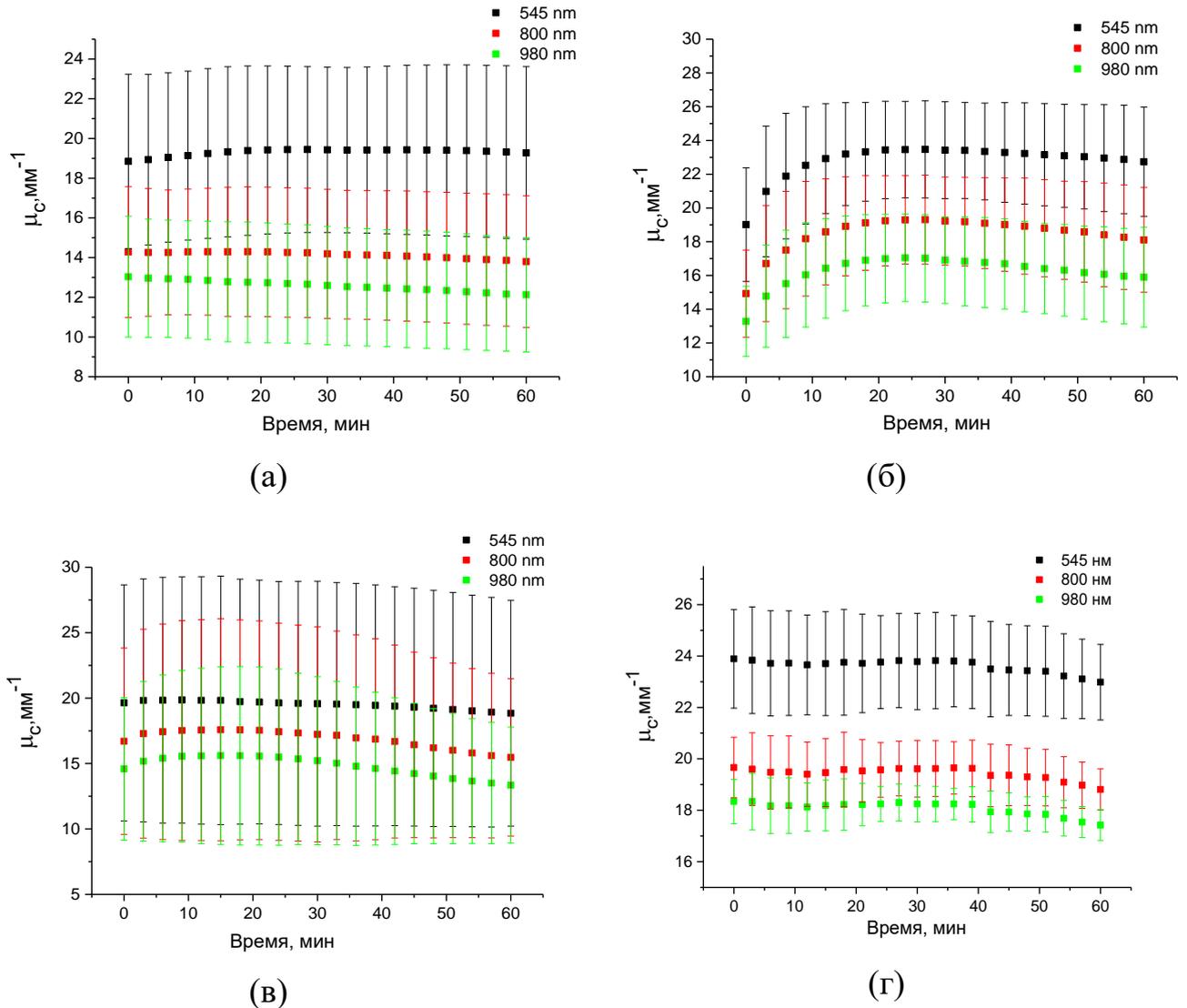


Рисунок 4.8 – Зависимость коэффициента ослабления коллимированного излучения мышцей крысы от времени при температуре 40 (а), 50 (б), 60 (в) и 70 (г) °С

На Рисунке 4.9 представлены временные зависимости коэффициента ослабления коллимированного излучения жировой ткани крысы, выдерживаемым при различных постоянных температурах. Очевидно, что фазовые переходы происходят уже в процессе нагревания жировой ткани до заданной температуры. Это видно из того, что при выдержке при заданной температуре происходит лишь «кажущееся» уменьшение коэффициента ослабления без изменения динамики и изломов зависимости. Это «очевидное» связано с тем, что наиболее вероятно

уменьшение коэффициента ослабления связано с уменьшением толщины образца из-за вытекания жира. В то же время при нагреве до заданной температуры наблюдается увеличение коэффициента ослабления, обусловленное коагуляцией белковой части образца. При этом степень коагуляции и, соответственно, коэффициент ослабления зависят от скорости нагрева и температуры. А именно, чем выше поднимается температура, тем больше у нас начальное значение коэффициента ослабления.

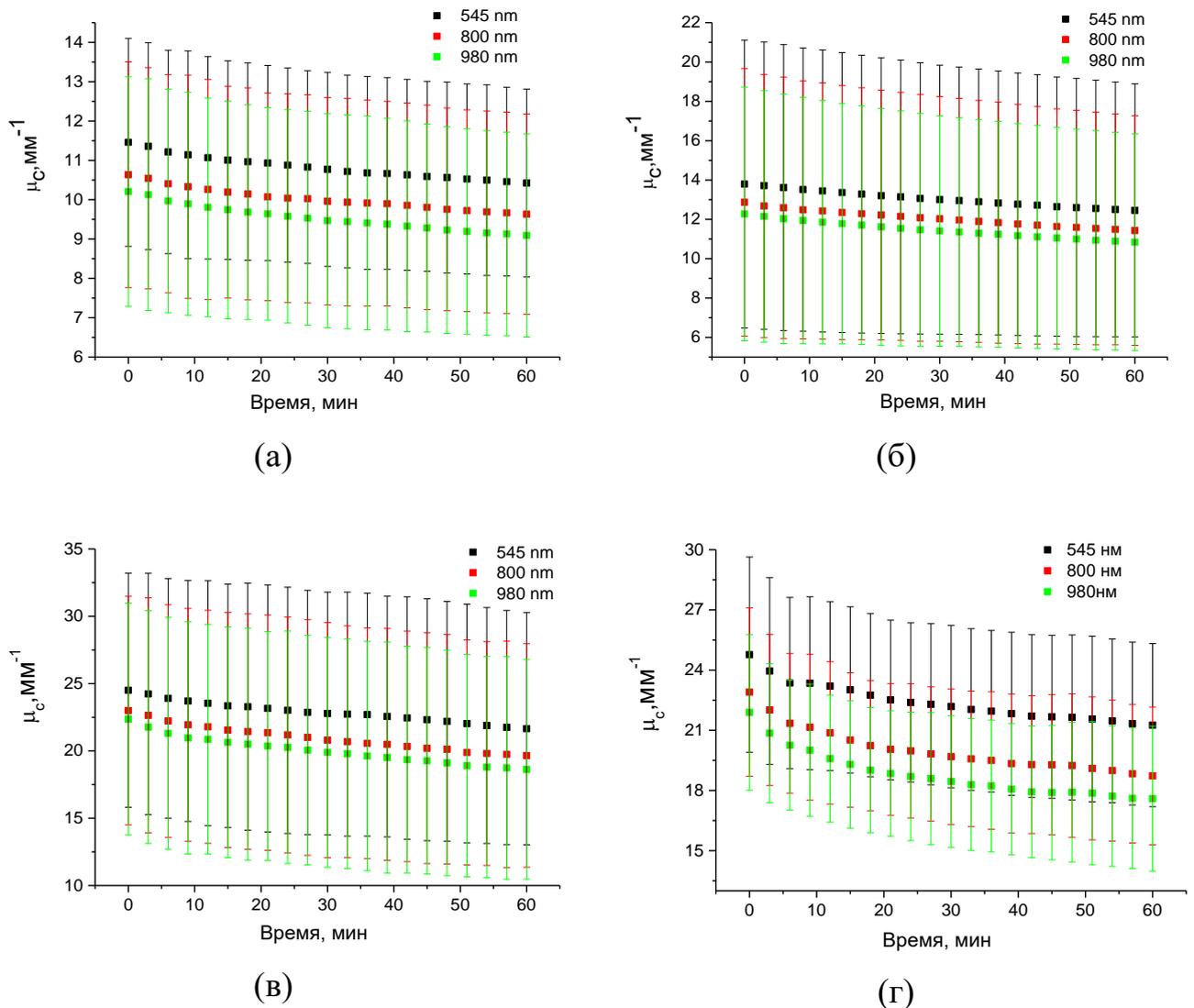


Рисунок 4.9 – Зависимость коэффициента ослабления коллимированного излучения жиром крыс от времени при температуре при 40 (а), 50 (б), 60 (в) и 70 (г) °С

На Рисунках 4.10-11 представлены временные зависимости коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей крысы, выдерживаемой при различных фиксированных температурах. Изменение ослабления при нагревании начинается при температурах 60–70 °С в связи с большей термостабильностью кожи по сравнению с мышечной тканью.

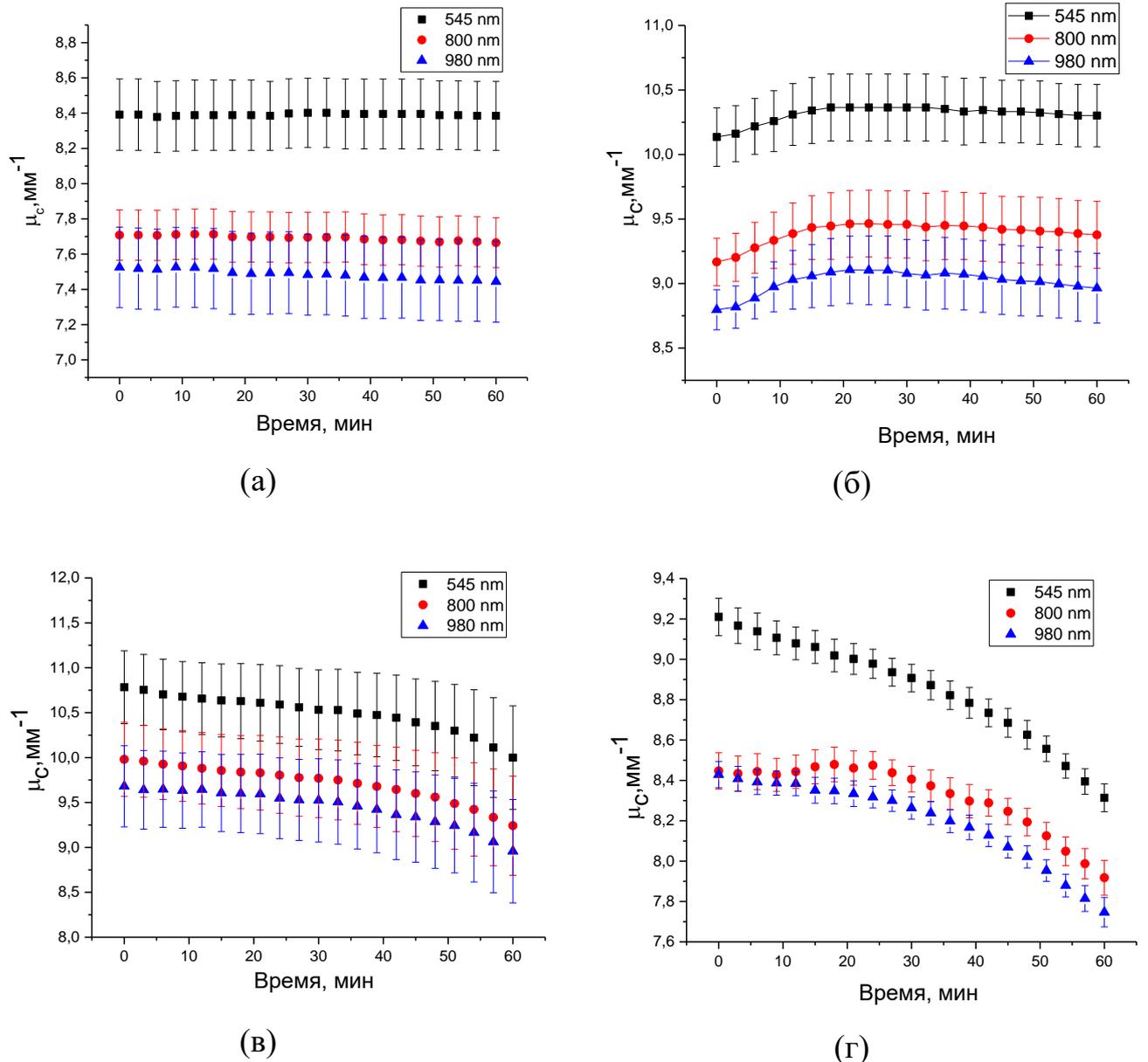


Рисунок 4.10 – Зависимость коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей крысы со стороны эпидермиса при температурах 45 (а), 50 (б), 60 (в) и 70 (г) °С

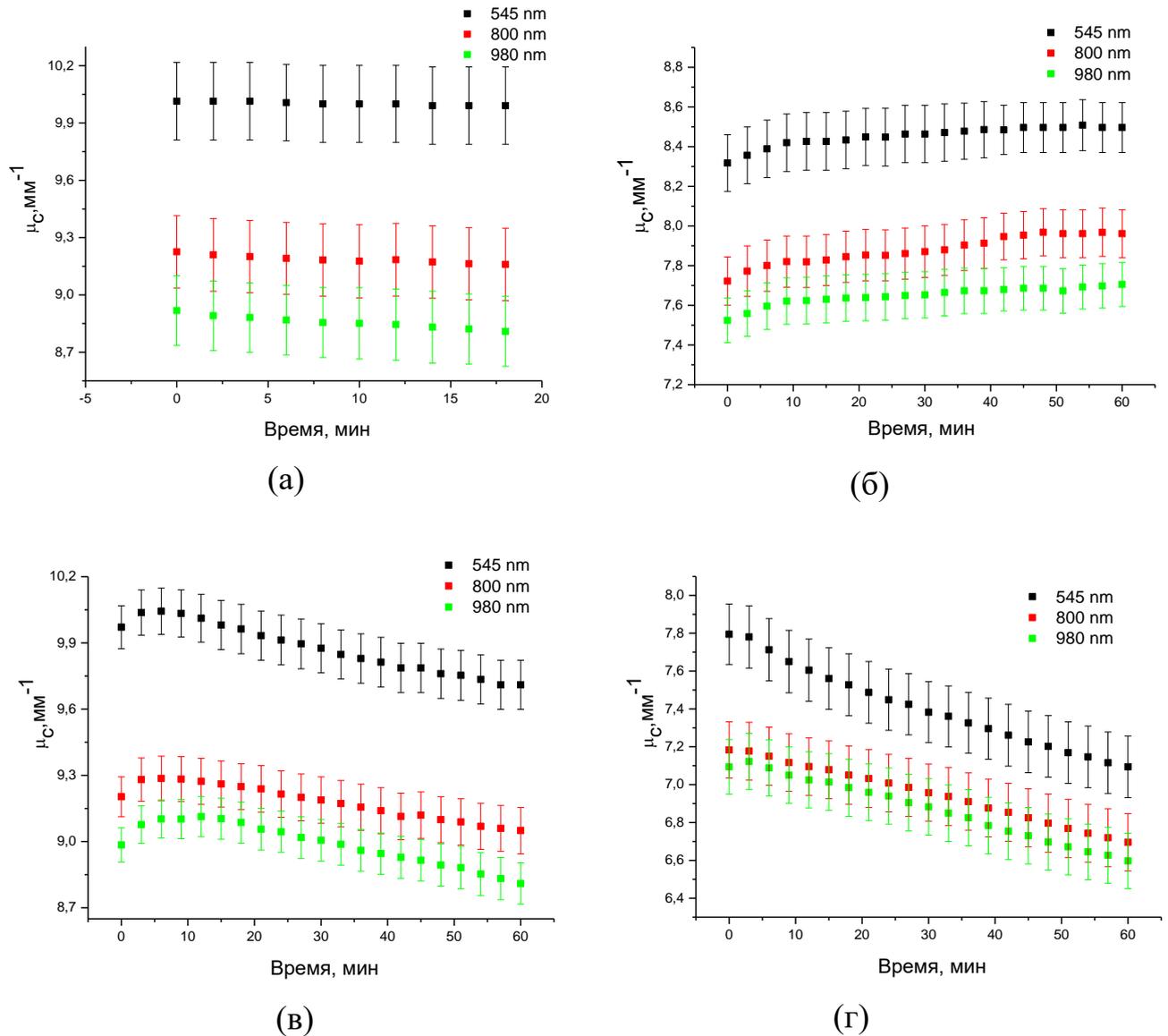


Рисунок 4.11 – Зависимость коэффициента ослабления коллимированного излучения кожей крысы со стороны дермы при температурах 45 (а), 50 (б), 60 (в) и 70 (г) °С

Коэффициент ослабления незначительно изменяется при длительном слабом нагреве. Однако анализ начальных значений коэффициента ослабления показывает, что они сильно зависят от температуры. Можно сделать вывод, что изменения коэффициента ослабления происходят быстро и в основном заканчиваются при достижении образцом заданной температуры (3–4 мин). При увеличении температуры прогресса характер динамики может изменяться.

Наблюдается как рост коэффициента ослабления при меньших температурах, так и спад при больших.

Выводы

Показано, что поддержание влажности позволяет исключить искажения спектров вследствие высыхания и повышенной коагуляции ткани при температурах вплоть до 45°C.

При больших температурах происходит изменение состояния поверхностных слоев образца, что приводит к увеличению поглощения и рассеяния в нем.

Реализованные условия позволяют получить результаты, наиболее приближенные к результатам, ожидаемым при воздействии тепла или при лазерном нагреве *in vivo*.

Показано, что при прохождении света через кожу со стороны дермы ослабление света меньше, чем со стороны эпидермиса. Это может быть связано с тем, что рассеяние света в эпидермисе выше, чем в дерме. Соответственно, данный факт необходимо принимать во внимание при расчете коэффициентов ослабления люминесценции и коррекции спектров.

Охарактеризованы изменения спектральных характеристик биологических тканей крыс в результате термообработки при повышенных (> 40°C) температурах при длительном (60 мин) и при ступенчатом нагреве.

Показано, что динамика изменения коллимированного пропускания кожи крысы зависит от температуры. При этом изменения происходят быстро и в основном в течение 3–5 минут заканчиваются. Последующие изменения более плавные и незначительные. Наиболее резкие изменения происходят при температурах выше 45°C. Нагрев образцов кожи крыс приводит к изменению коэффициента анизотропии за счет коагуляции коллагеновых волокон. Изменение кожного поглощения при нагревании начинается при температурах 60–70°C в связи с большей термостабильностью кожи по сравнению с мышечной тканью.

Спектр поглощения преимущественно гемоглобина накладывается на спектр рассеяния мышечной ткани. Нагревание изменяет структуру гемоглобина, что влияет на динамику поглощения. Коагуляция тканей отсутствует при нагревании образцов мышечной ткани до заданной температуры при температуре до 60 °С. При 70°С нагрев приводит к увеличению поглощения.

Фазовые переходы в жировой ткани происходят уже в процессе нагревания до заданной температуры. Степень коагуляции и, соответственно, коэффициент ослабления зависят от скорости нагрева и температуры. А именно, чем выше поднимается температура, тем больше у нас начальное значение коэффициента ослабления.

ГЛАВА 5. РЕГИСТРАЦИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НАНОЧАСТИЦ, ВНЕДРЕННЫХ ПОД КОЖУ

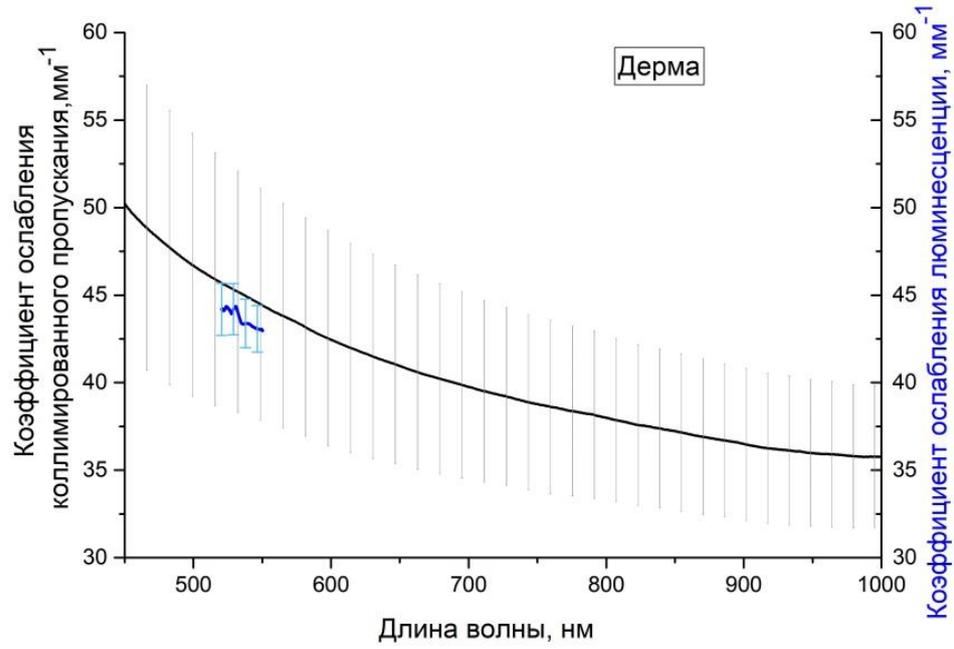
Контроль состояния живых объектов спектральными методами, как правило, осуществляется по спектрам отражения и люминесценции. При этом возможно одновременное фототермическое или фотодинамическое воздействие и контроль результатов данного воздействия. Однако спектры люминесценции и отражения искажаются вследствие рассеяния и переотражения света в объекте.

Целью нашего исследования является выявление влияния геометрии эксперимента на степень искажений люминесценции внедренных под кожу наночастиц.

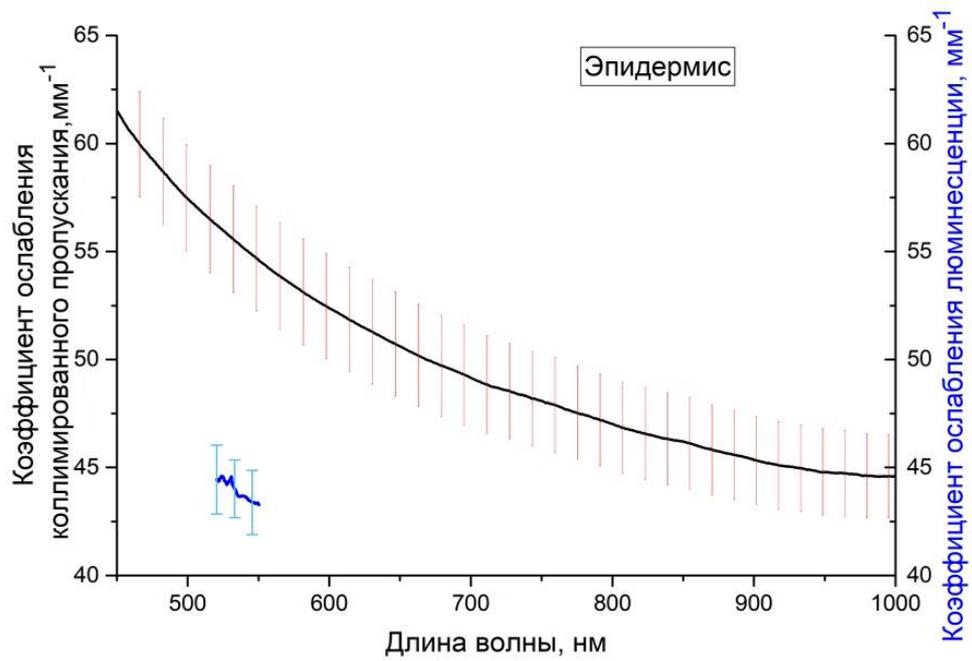
5.1. Регистрация люминесценции при помощи широкоапертурных фотообъективов

Нами проводилась регистрация спектров коллимированного пропускания и люминесценции. Исследованы образцы мышц и кожи крысы с обеих сторон.

В качестве источника люминесценции использовались синтезированные нами наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ [7]. Полученные спектральные зависимости коэффициентов ослабления приведены на Рисунках 5.1, 5.2. В случае люминесценции спектры приведены в области 520–550нм, в которой люминесцируют наночастицы и определяется температура.



(a)



(б)

Рисунок 5.1 – Сравнение коэффициента ослабления коллимированного (черный) и широкоугольного (синий) света образцов ткани кожи крысы: (а)-кожа внутренней стороной к источнику света; (б)- кожа внешней стороной к источнику света

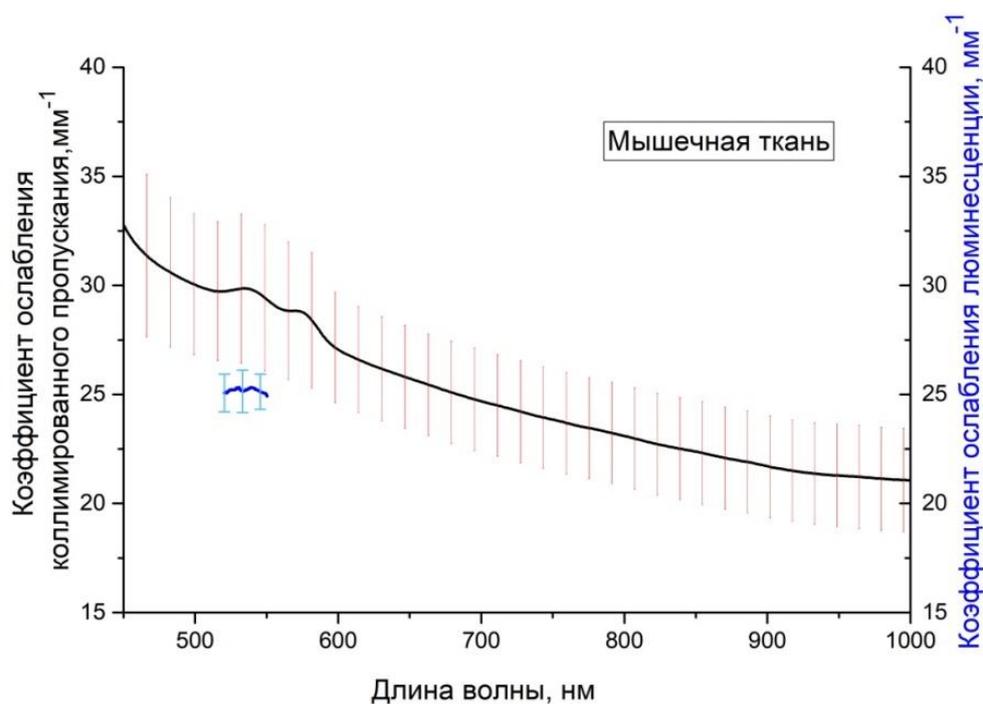


Рисунок 5.2 – Сравнение коэффициента ослабления коллимированного (черный) и широкоугольного (синий) света образцов мышечной ткани крысы

На Рисунке 5.3 показано отношение I_t / I_{tc} для различных тканей крысы, где I_t – коэффициент ослабления люминесценции, I_{tc} – коэффициента ослабления коллимированного пропускания.

Сравнение полученных коэффициентов затухания показывает постоянство их отношения с незначительной погрешностью. На основании полученных данных можно сделать вывод, что использование данных коллимированного пропускания для учета затухания люминесценции при прохождении через биологические ткани и сборе излучения в широкой апертуре является правильным. Однако в данном случае исследовался только малый участок спектра шириной 35 нм. Представляет интерес исследование в более широком диапазоне.

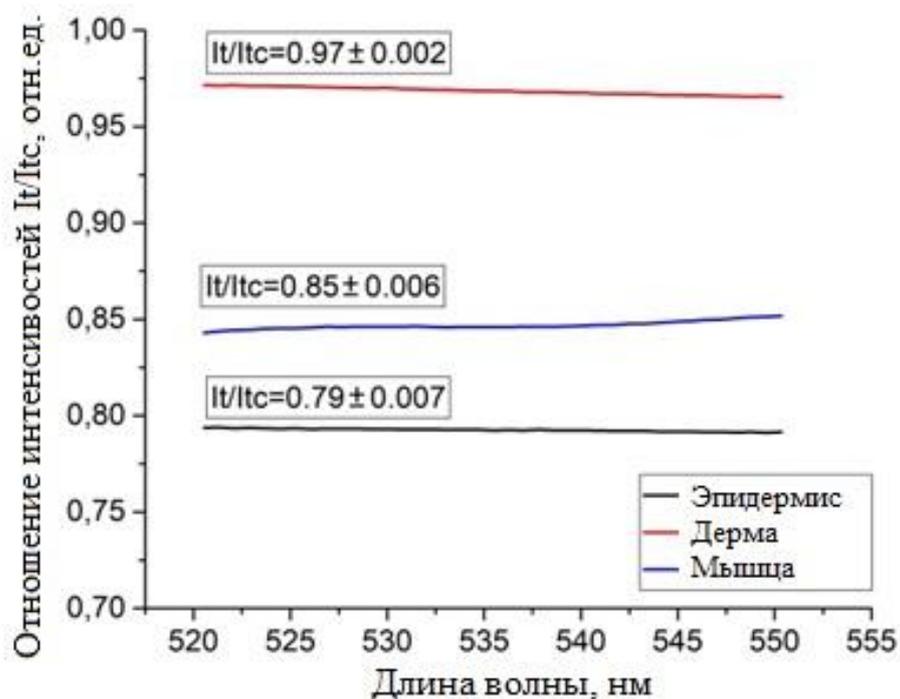


Рисунок 5.3 –Отношение I_t / I_c для различных тканей крысы

5.2 Синтез и характеристика наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ для контроля состояния биологической ткани

Для исследования искажений в широком (порядка 200 нм) диапазоне нами использовались полупроводниковые наночастицы.

В настоящее время для плазмонной фототермической терапии используются углеродные нанотрубки и апконверсионные наночастицы [61, 62]. Перспективным является использование полупроводниковых наночастиц, так как с помощью них можно проводить фототермическую терапию одновременно с определением локальной температуры опухоли путем регистрации температурно-зависимых спектров их люминесценции. Однако большинство исследованных полупроводниковых наночастиц содержат высокотоксичные тяжелые металлы (например, кадмий и свинец), что сильно ограничивает их применение в биологии и медицине. Альтернативой может являться дисульфид меди с примесью индия

(CuInS_2 , для которых в литературе часто применяется аббревиатура CIS). Это прямозонный полупроводник с запрещенной зоной 1,45 eV для объемного материала, высоким коэффициентом экстинкции в видимом спектральном диапазоне ($k \geq 104 \text{ см}^{-1}$ [63]). Спектры поглощения и люминесценции CuInS_2 расположены в окне прозрачности биоткани. Наночастицы CuInS_2 исключительно устойчивы к радиации и дефектообразованию [64]. Показана малая токсичность наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$: начало местного воспаления при их использовании происходит только при концентрации в 10 раз больше, чем для их Cd-содержащих аналогов [65]. Таким образом, частицы CuInS_2 это материал с низкой токсичностью и оптическими свойствами, обеспечивающими применение в фототермической терапии.

В зависимости от параметров синтеза, спектр люминесценции наночастиц может быть расположен в различных областях - от желтой до ближнего ИК области. Это позволяет их использование в биомедицине не только для терапии рака, но и для диагностики при мультиспектральной визуализации клеток. Спектры люминесценции этих наночастиц зависят от их температуры, что позволяет использование наночастиц CuInS_2 в качестве нанотермометров.

Наночастицы CuInS_2 были синтезированы нами по следующему методу:

В колбу объемом 50 мл наливали 28,1 мл воды. При постоянном перемешивании добавляли 0,6 мл раствора соли базового металла (0,05 M CuNO_3). Затем добавляли раствор соли примесного металла (0,21 мл 1 M InCl_3). После перемешивания добавляли 0,2 мл 1 M тиогликолевой кислоты (HSCH_2COOH). В результате раствор окрашивался в темно-синий цвет вследствие образования тиогликолятных солей. Затем приливали 0,3 мл концентрированного раствора аммиака (NH_4OH). При этом происходило разрушение осадков тиогликолятных солей в щелочной среде и образование новых комплексов, раствор становился прозрачным. Далее быстро вводили 0,174 мл концентрированного раствора сульфида аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{S}$), раствор принимал красно-оранжевый цвет в результате образования зародышей нанокристаллов.

Полученную смесь нагревали до 95 °С и выдерживали при этой температуре в течение 20 минут, непрерывно перемешивая. Постепенно цвет раствора становится темно-коричневым, что указывает на увеличение размера наночастиц.

Полученные наночастицы покрывали оболочкой ZnS:

Полученный раствор наночастиц CuInS_2 нагревали до 90 °С. При непрерывном перемешивании раствора добавляли 0,3 мл 0,1 М раствора хлорида цинка (ZnCl_2). При этом соотношение молей Cu/Zn составляло 1:1. Раствор нагревали в течение 10 минут, после чего остужали.

Синтезированные наночастицы имеют форму стержней с размером в диапазоне от 11 до 20 нм (Рисунок 5.4).

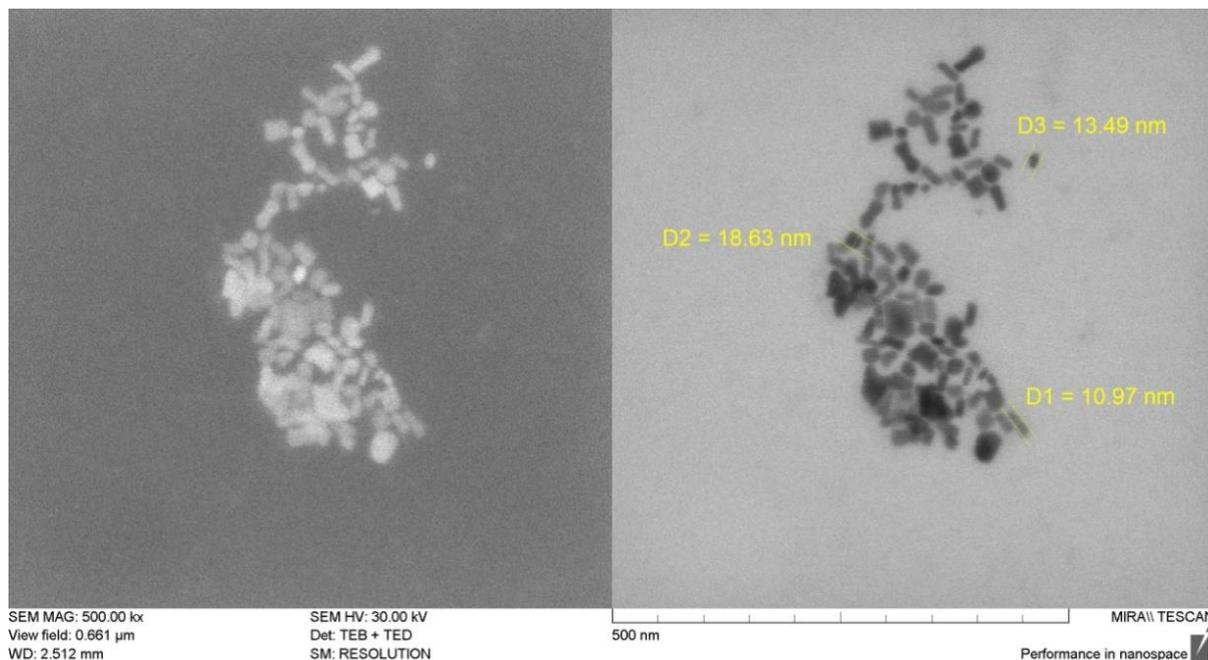


Рисунок 5.4 – Изображения наночастиц, полученные с помощью электронного микроскопа

На Рисунке 5.5 представлены спектры люминесценции, полученные при различных временах роста наночастиц. Изменение спектров продолжается в течение 2 часов после окончания синтеза, что говорит о созревании наночастиц. При росте наночастиц интенсивность в красной области спектра постепенно возрастает, затем, после 40 минут синтеза начинает уменьшаться (Рисунок 5.6).

При этом спектр люминесценции смещается в длинноволновую область, и положение максимума спектра достигает 780 нм. Это не может быть связано с перепоглощением люминесценции в растворе вследствие увеличения оптической плотности, так как поведение спектров сохраняется и при разбавлении раствора в 100 раз. Можно сделать вывод, что максимальная интенсивность люминесценции наночастиц достигается при времени синтеза 20 минут. При этом максимум спектра люминесценции расположен в области 720–730 нм.

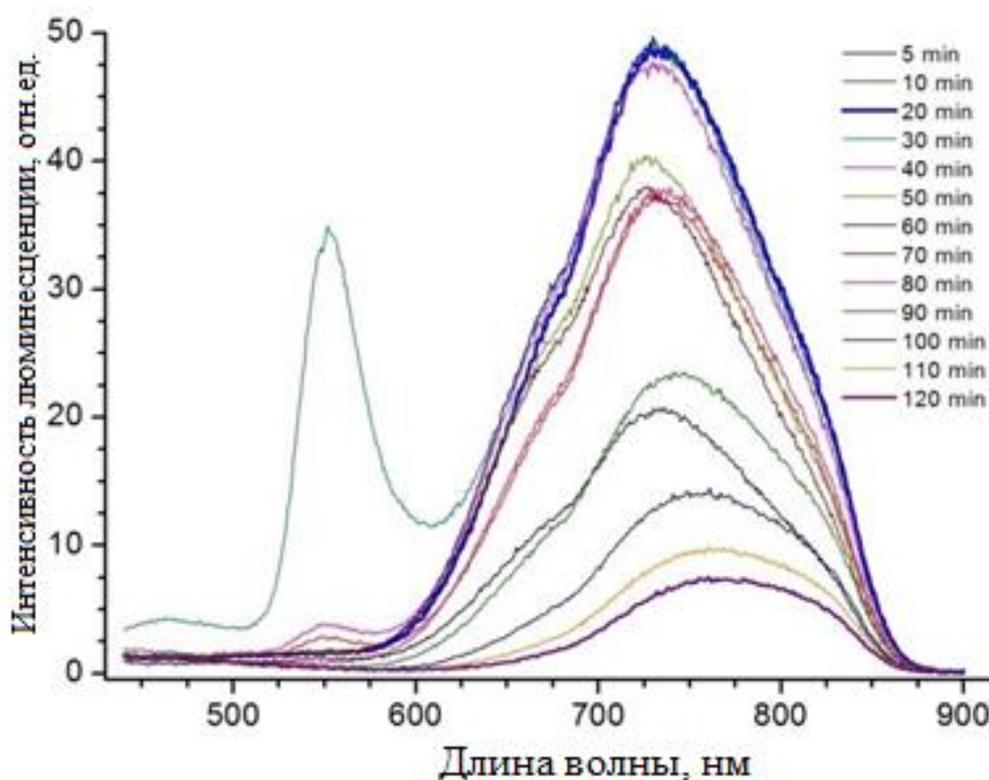


Рисунок 5.5 – Спектры люминесценции наночастиц CuInS_2 при различных временах синтеза в течение 2 часов;

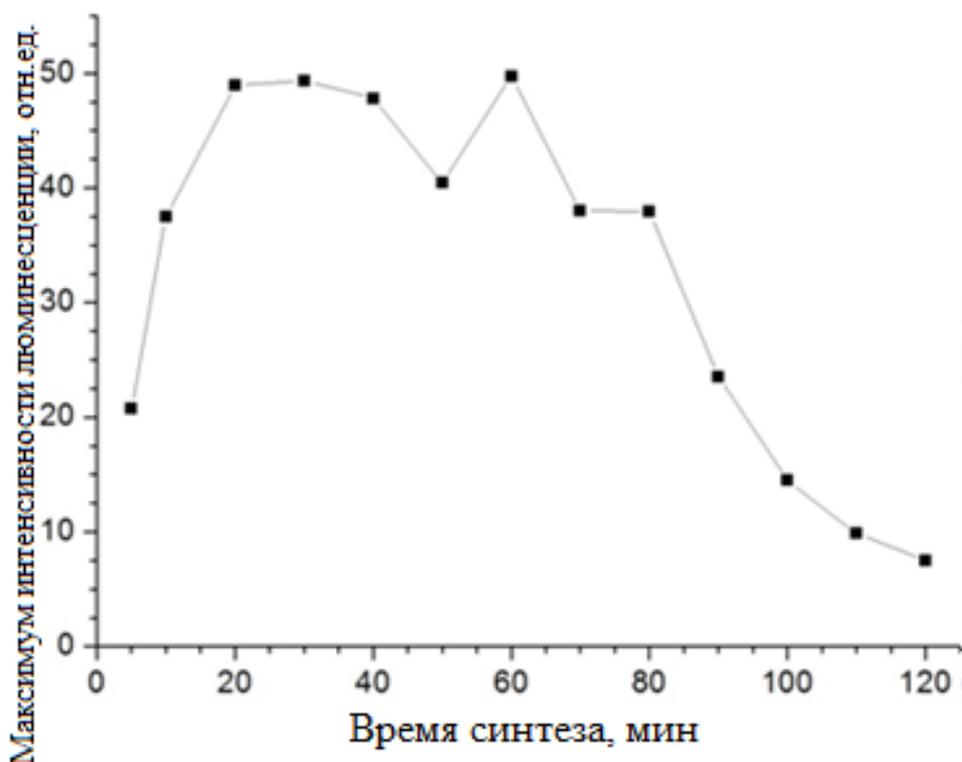


Рисунок 5.6 – Динамика изменения интенсивности люминесценции наночастиц CuInS_2 в максимуме длинноволновой полосы

Полоса люминесценции в области 550 нм может быть связана с образованием наночастиц малого размера – квантовых точек. При увеличении времени синтеза размер наночастиц растет, при этом уменьшается коротковолновая полоса с одновременным ростом длинноволновой [66]. На Рисунке 5.6 представлено изменение спектров люминесценции синтезированных в течение разного времени наночастиц CuInS_2 вследствие их покрытия оболочкой ZnS . Как видно из сравнения рисунков 5.5 и 5.7, интенсивность люминесценции покрытых наночастиц в 5 раз больше, чем непокрытых.

Рисунок 5.8 показывает различие интенсивности люминесценции наночастиц в зависимости от величины промежутка времени от синтеза до покрывания частиц оболочкой. Из спектров следует, что покрывание частиц сразу после синтеза дает существенно большую интенсивность люминесценции, поэтому для дальнейших экспериментов выбрана эта методика.

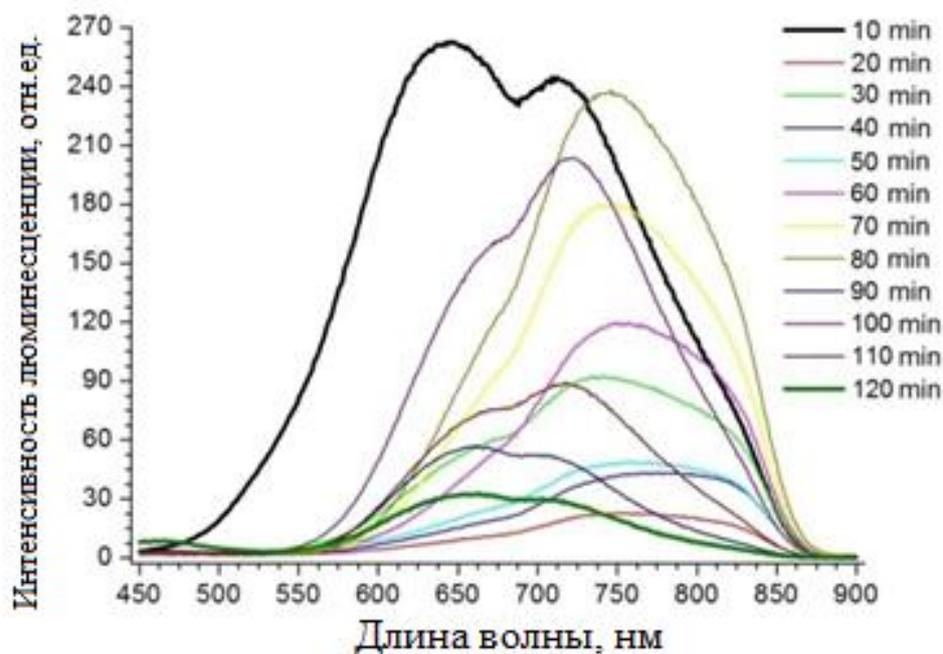


Рисунок 5.7 – Спектры люминесценции синтезированных в течение разного времени наночастиц CuInS_2 , покрытых оболочкой ZnS

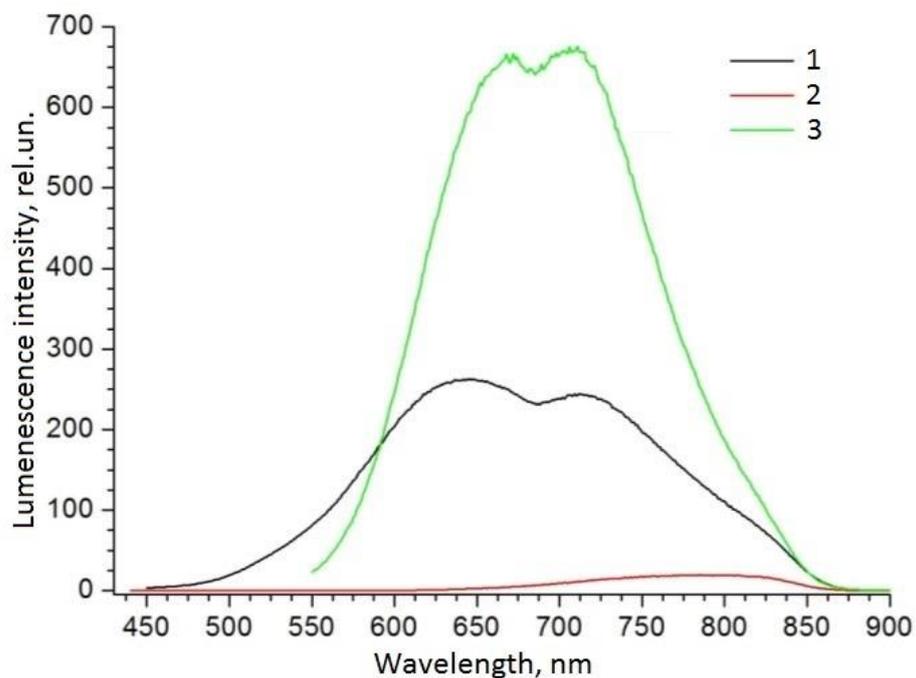


Рисунок 5.8 – Спектры люминесценции наночастиц CuInS_2 покрытых оболочкой ZnS в разное время после синтеза. (1-через сутки после синтеза, 2-без покрытия, 3-сразу после синтеза)

На Рисунке 5.9, 5.10 изображены спектры люминесценции и возбуждения наночастиц, синтезированных при разном соотношении In/Cu. При уменьшении содержания Cu в наночастицах люминесценция в максимуме полосы увеличивается. При этом форма спектров остается постоянной (Рисунок 5.11) за исключением спектра образца с соотношением концентраций In/Cu, равном 4. Можно сделать вывод о том, что тип излучающих центров не меняется при изменении концентрации меди в широких пределах. Предполагается, что спектр возбуждения в данном диапазоне обусловлен наличием дефектов кристаллической решетки – ионов меди.

С уменьшением концентрации меди наблюдается тенденция роста полосы возбуждения. Не стационарность роста может быть вызвана как отклонениями процесса роста, так и возможным наличием двух типов решетки – изолированных ионов меди в решетке сульфида индия при малой концентрации меди и тройного соединения CuInS_2 – при большой концентрации.

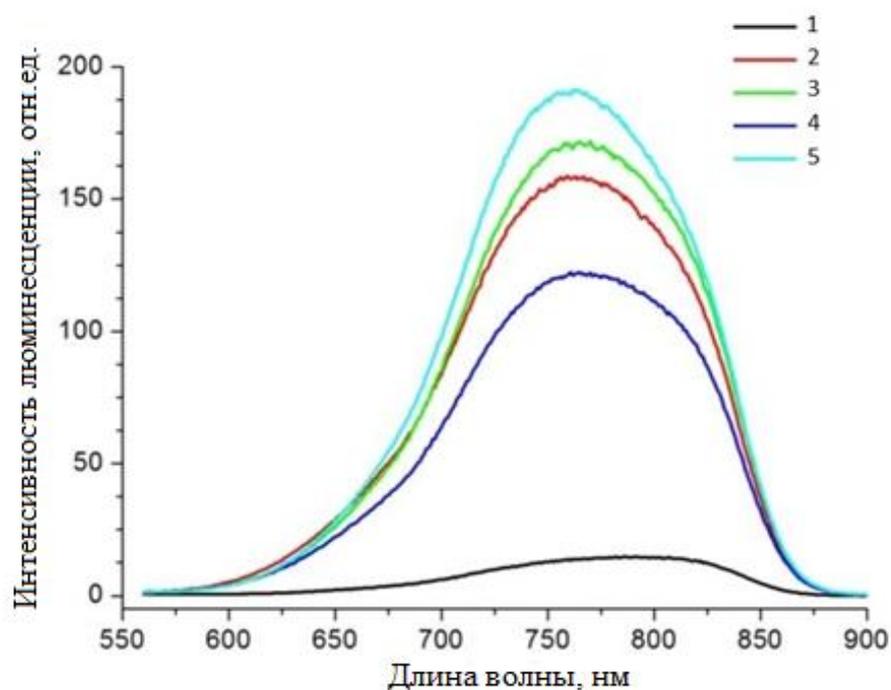


Рисунок 5.9 – Спектры люминесценции наночастиц CuInS_2 при разных соотношениях In/Cu

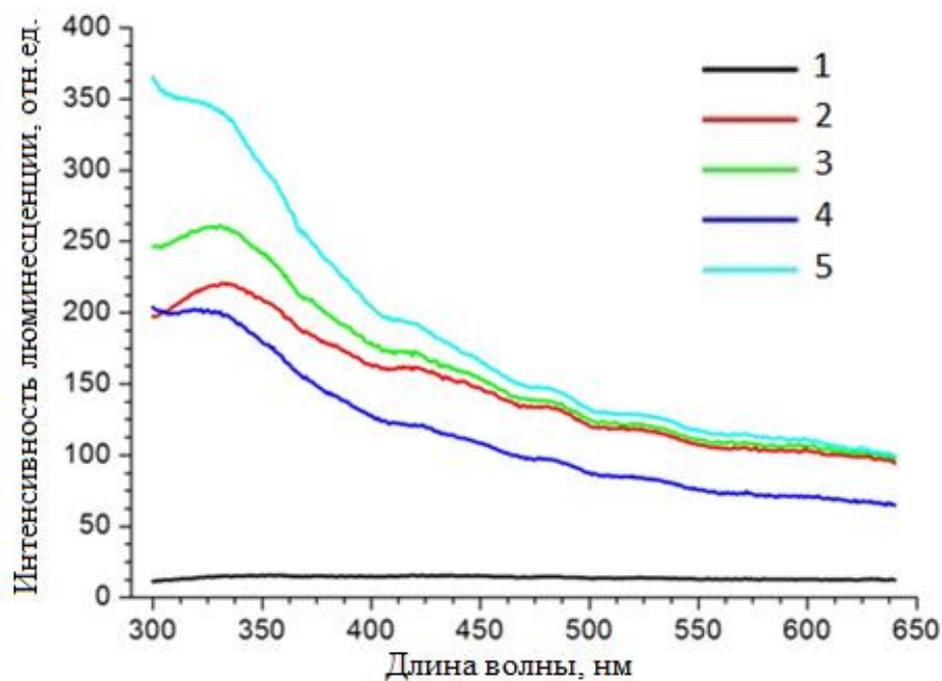


Рисунок 5.10 – Спектры люминесценции возбуждения наночастиц CuInS₂ при разных соотношениях In/Cu

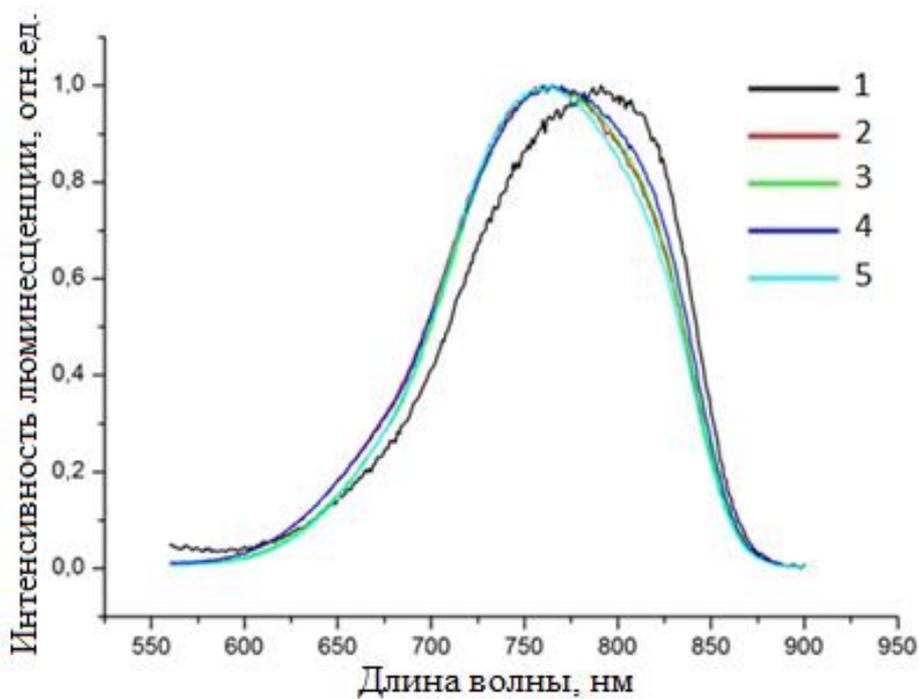


Рисунок 5.11 – Наложение нормированных спектров люминесценции наночастиц CuInS₂ при разных соотношениях In/Cu

На Рисунках 5.12- 5.15 приведены спектры люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ полученные при разных температурах раствора. При увеличении температуры интенсивность люминесценции наночастиц постепенно уменьшается (Рисунки 5.12, 5.13). Изменение интенсивности в максимуме люминесценции имеет линейный характер (Рисунки 5.14, 5.15), однако угол наклона меняется при изменении концентрации наночастиц: при разбавлении частиц в 10 раз наклон составляет $-0,4\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, в то время как при разбавлении в 100 раз только $-0,18\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$.

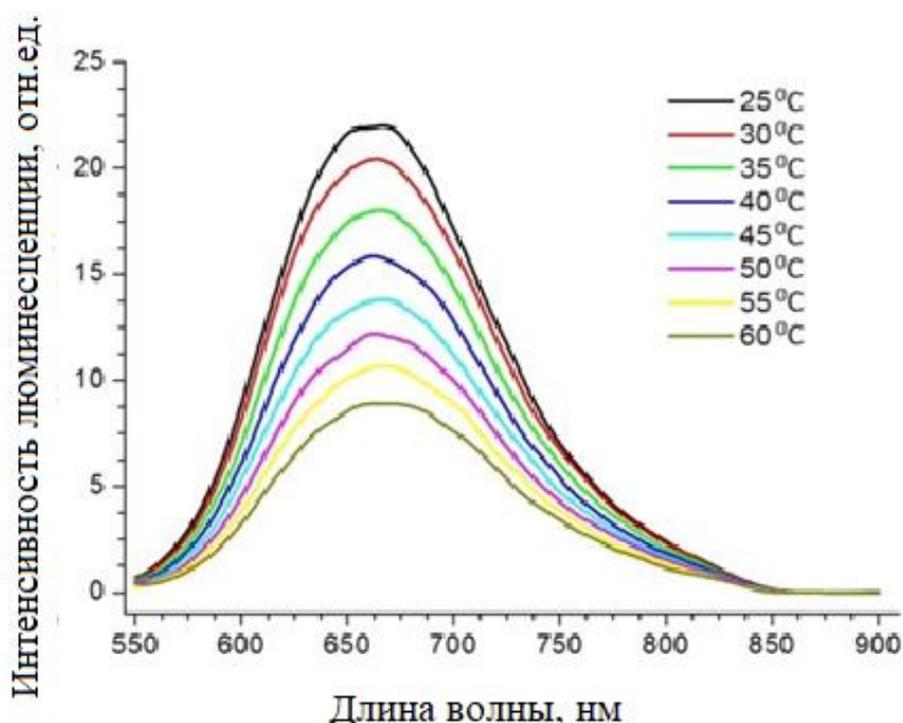


Рисунок 5.12 – Спектры люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, полученные при различных температурах раствора (исходный раствор разбавлен в 10 раз)

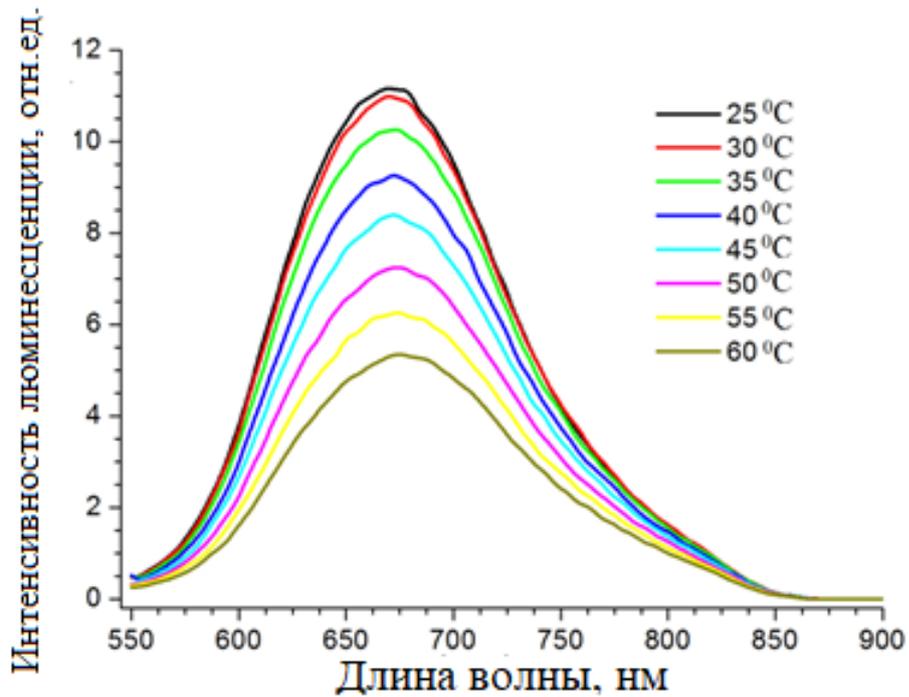


Рисунок 5.13– Спектры люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, полученные при различных температурах раствора (исходный раствор разбавлен в 100 раз)

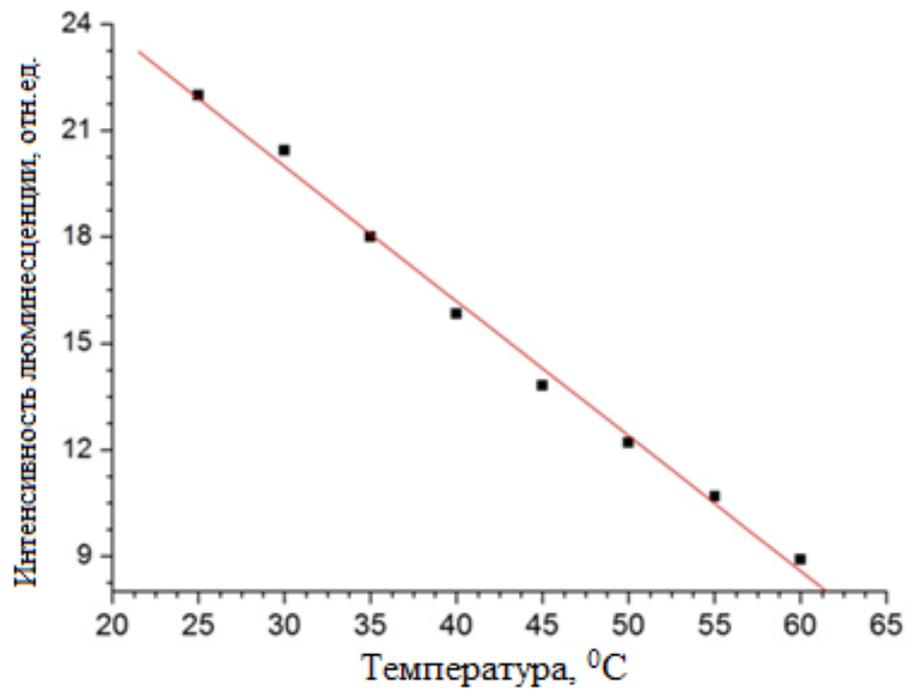


Рисунок 5.14 – Температурная зависимость интенсивности люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ в максимуме полосы (исходный раствор разбавлен в 10 раз)

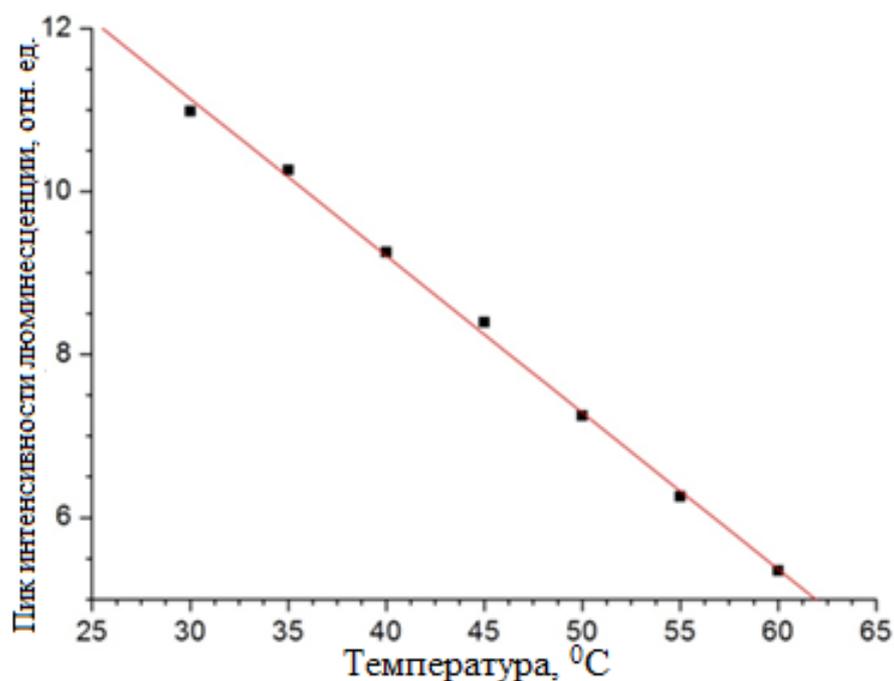
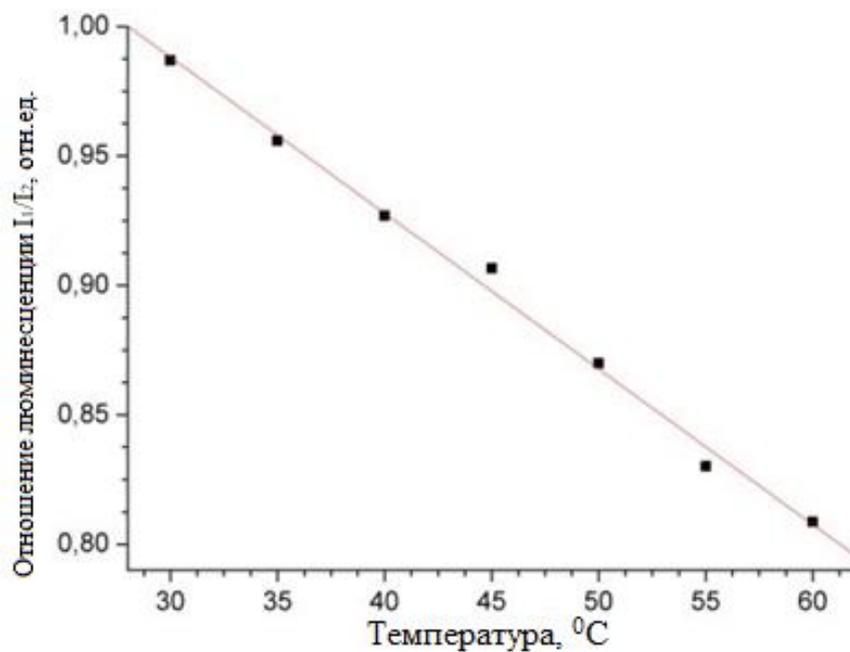
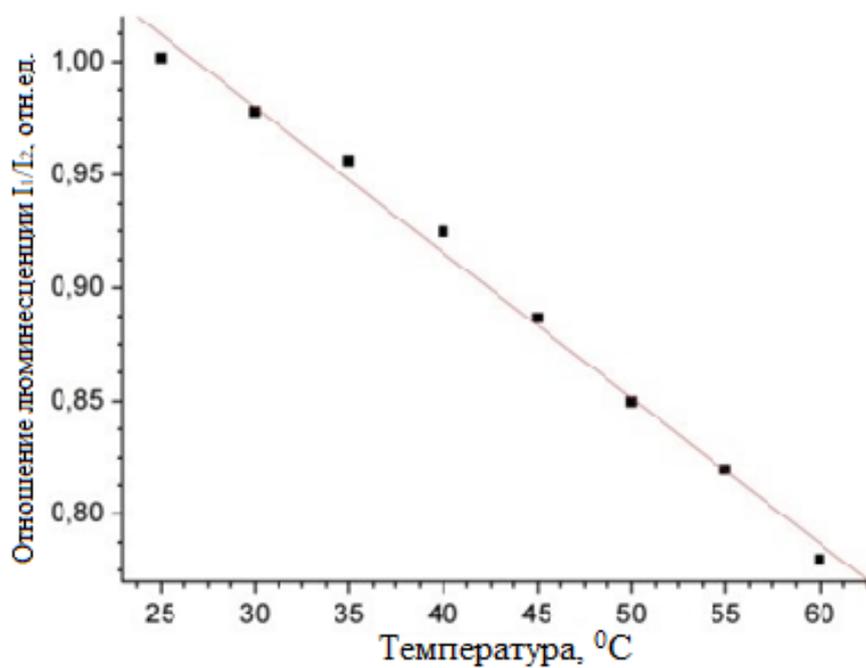


Рисунок 5.15 – Температурная зависимость интенсивности люминесценции наночастиц CuInS₂/ZnS в максимуме полосы (исходный раствор разбавлен в 100 раз)

Зависимость наклона от концентрации наночастиц не позволяет достоверно определять их температуру. Вследствие этого нами разработан другой метод определения температуры. На Рисунке 5.16 приведены зависимости отношения интенсивностей люминесценции на полувисоте спектральной линии от температуры наночастиц, разбавленных в 10 и в 100 раз. В обоих случаях температурная зависимость аппроксимируется линейной функцией вида $I_1/I_2 = A + Bt$, при этом значения $A = 1,17 \pm 0,01$ и $B = -0,006 \pm 0,0002$ не зависят от концентрации наночастиц. Следует отметить, что указанные параметры различаются для различных синтезов, и вновь полученные наночастицы необходимо калибровать.



(а)



(б)

Рисунок 5.16 – Зависимость отношения интенсивностей на полувысоте спектральной линии люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ от температуры раствора: исходный раствор наночастиц разбавлен (а)- в 10 раз; (б)- в 100 раз

На Рисунке 5.17 приведены спектры люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ при разных значениях pH раствора. При увеличении pH образца интенсивность люминесценции наночастиц постепенно уменьшается (Рисунок 5.18). Однако, наложение нормированных спектров показывает отсутствие сдвига полосы люминесценции (Рисунок 5.19). Соответственно, температурная зависимость спектров, полученная согласно предложенной методике, также не зависит от pH окружения наночастиц.

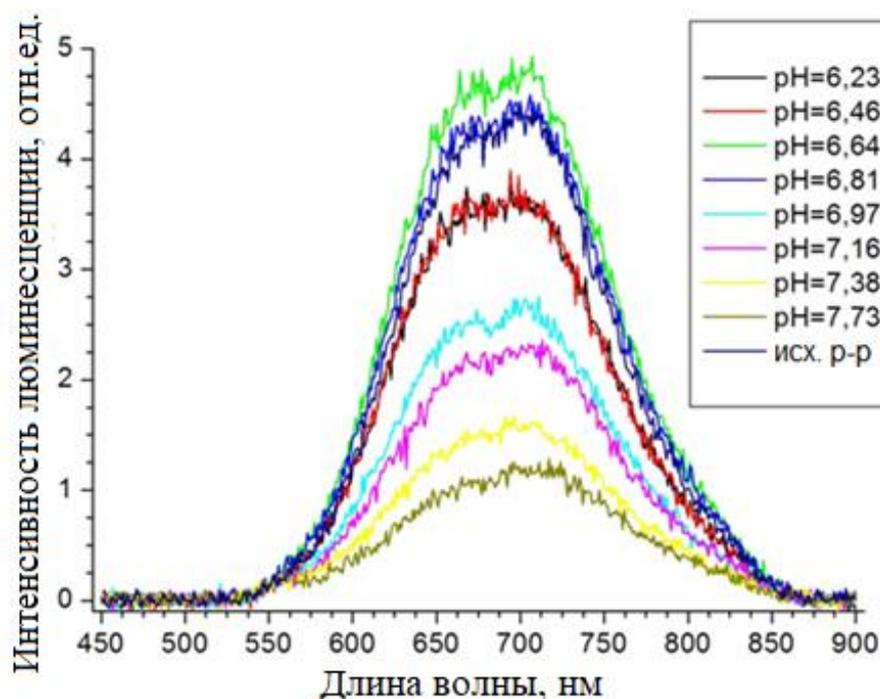


Рисунок 5.17 – Спектры люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, полученные при различных значениях pH раствора

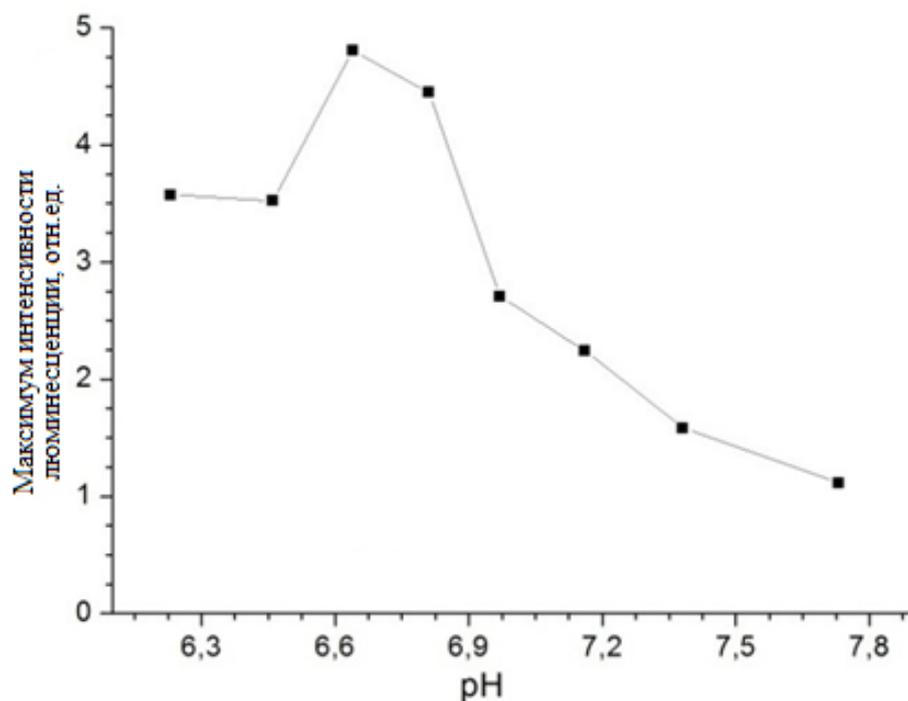


Рисунок 5.18 – Изменение интенсивности люминесценции в максимуме полосы в зависимости от рН раствора

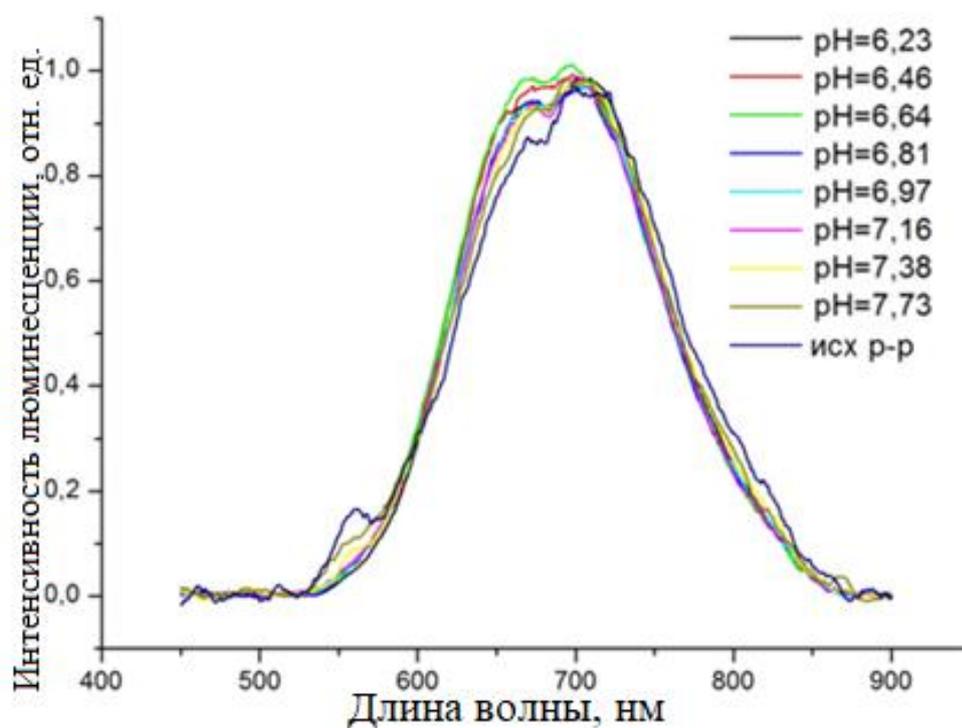


Рисунок 5.19 – Наложение нормированных спектров люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, полученных при различных значениях рН раствора

Нами показано, что, в результате синтеза по разработанной методике образуются наночастицы $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, свойства которых изменяются в течение некоторого времени после синтеза. Люминесценция созревших наночастиц находится в области 600–850 нм. Покрытие наночастиц оболочкой ZnS значительно увеличивает люминесценцию.

При нагревании наночастиц наблюдается тушение люминесценции и небольшое смещение пика. Изменение соотношения In/Cu в частицах также влияет на интенсивность люминесценции. Изменения pH взвеси наночастиц в физиологических рамках также уменьшает интенсивность люминесценции, но практически не влияет на отношение интенсивностей на половине высоты спектральной линии люминесценции. В связи с этим можно сделать вывод, что интенсивность люминесценции не может быть параметром для определения температуры наночастиц и для этой цели лучше использовать отношение интенсивностей на полувысоте спектральной линии люминесценции.

Полученные наночастицы имеют ряд преимуществ перед подобными нанообъектами:

- 1) широкий спектр люминесценции, который, находится в окне прозрачности биоткани, что позволяет провести более глубокое зондирование биологической ткани;
- 2) сильное поглощение в диапазоне 300–700 нм, что позволяет осуществлять одновременно нагрев наночастиц и определять их температуру;
- 3) малая токсичность по сравнению с аналогами.

5.3 Регистрация спектров люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ при сборе излучения в малой апертуре

Регистрация спектров люминесценции наночастиц и последующая обработка показали достаточно неожиданный результат.

Нами исследовалось изменение спектров люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$, расположенных под слоем кожи со стороны дермы. Таким образом, имитировалось внедрение наночастиц в подкожный слой. Регистрация спектров проводилась при помощи описанной ранее установки (Рисунок 1. Сбор излучения проводился спектрометром 2) с собором излучения при помощи малоапертурных коллиматоров. Коллиматор с входным диаметром 5 мм располагался на расстоянии 15 см от образца, поэтому можно считать, что проводилась регистрация коллимированного излучения.

В отсутствие кожи полувысота спектральной линии располагалась на 636 и 834 нм (Рисунок 5.20). Полоса в области 810 нм обусловлена вторым порядком дифракции возбуждающего лазерного излучения.

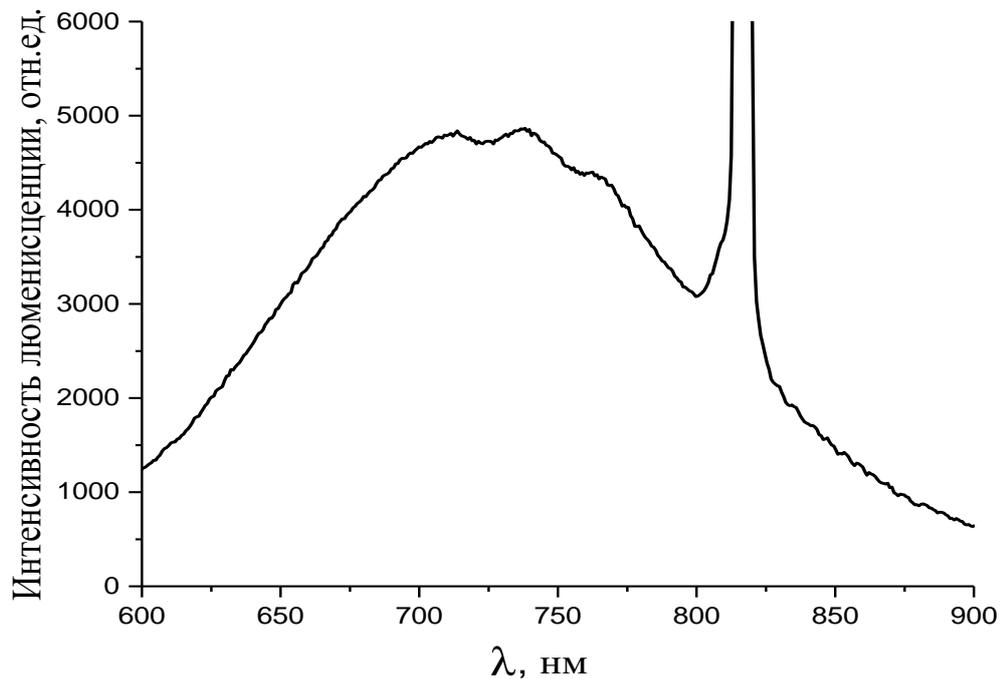


Рисунок 5.20 – Спектр люминесценции наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ (без слоя кожи)

На спектре видна полоса от второго порядка дифракции возбуждающего излучения, однако, она не мешает расчетам. Неоднородности формы полосы люминесценции обусловлены пропускием внутреннего фильтра спектрального прибора.

Расчет зависимости отношения интенсивностей люминесценции на полувысоте показал линейную зависимость (Рисунок 5.21). Зависимость описывается формулой $1,38-0,017t$.

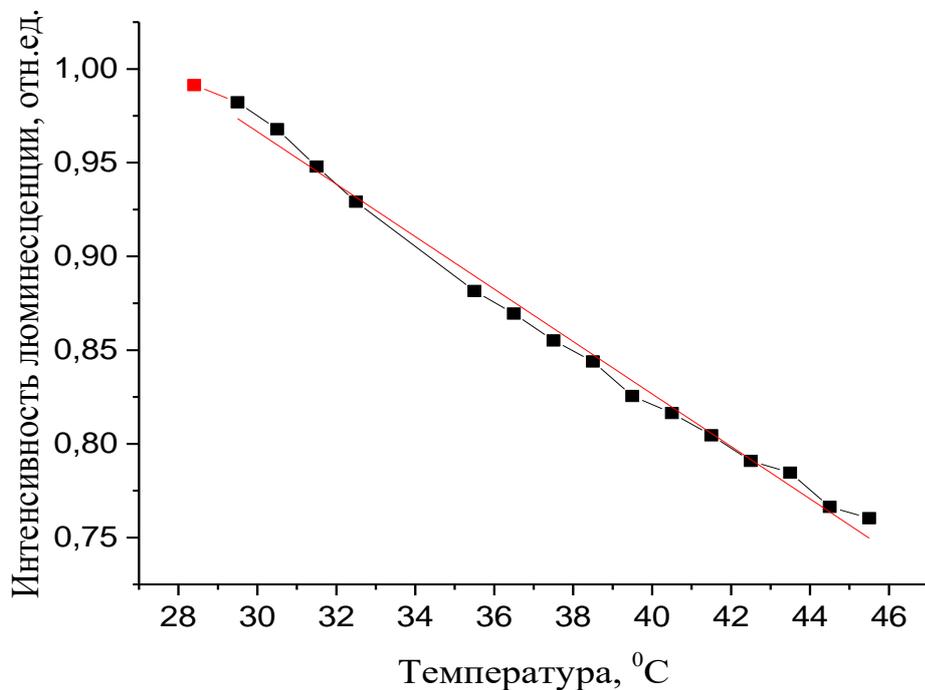


Рисунок 5.21 – Зависимость отношения интенсивностей люминесценции на полувысоте (без кожи), красная линия-аппроксимация

Результаты восстановления температуры наночастиц по спектрам, полученным при прохождении излучения через кожу, зависят от геометрии эксперимента.

При расположении собирающего люминесценцию коллиматора по нормали к поверхности кожи, то есть при регистрации коллимированного излучения погрешность определения температуры не превышает $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Такой результат

получается при использовании усредненного спектра коллимированного пропускания кожи со стороны дермы. Вызванные температурой изменения отношения коэффициентов пропускания на длинах волн 636 и 824 нм не превышают долей процента, поэтому мы использовали фиксированное значение отношений (1,082). Недостаточно высокая точность определения температуры вызвана несовпадением данного отношения для используемой кожи и для усредненных значений. Однако полученный результат означает, что можно с относительно высокой точностью определять температуру наночастиц, внедренных под кожу, не зная ее коэффициентов пропускания.

В случае, когда коллиматор расположен под углом 15° , зависимость кардинально различается (Рисунок 5.22).

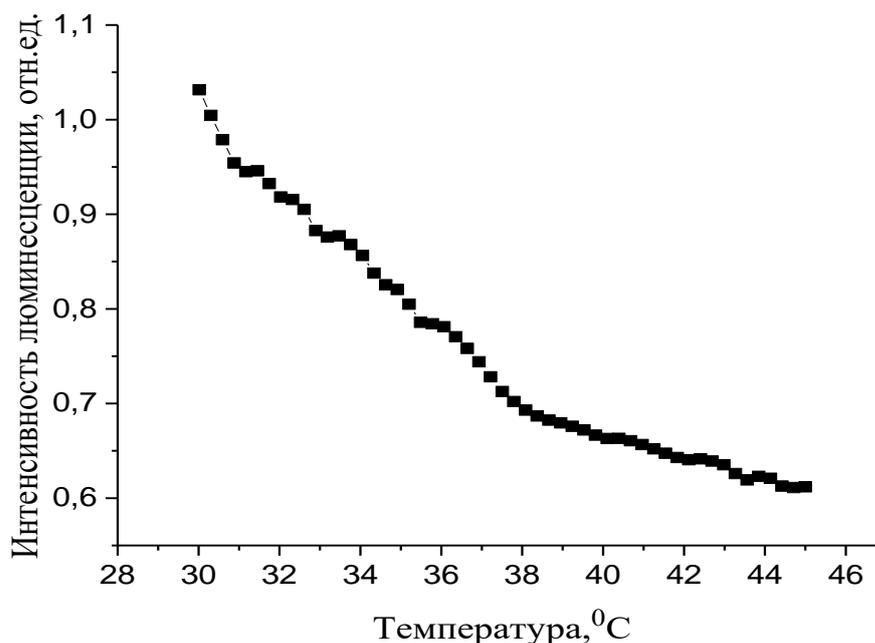


Рисунок 5.22 – Зависимость отношения интенсивностей люминесценции на полувысоте (с кожей, наночастицы находятся со стороны дермы) при сборе излучения под углом 15°

На графике можно выделить, как минимум, два линейных участка с переходом в области 35–38 °С. Так как этот диапазон соответствует фазовому переходу в жировой ткани, нами была предпринята попытка скорректировать спектры, разделив их на коэффициенты пропускания кожи при используемых температурах. Однако, так как, как указано выше, отношение коэффициентов пропускания на данных длинах волн практически не изменяется, коррекция не дала положительного результата. Погрешность определения температуры достигает 20 °С. Можно сделать вывод, что в данном случае не обеспечивается коллимированный режим сбора излучения.

Однако данный режим измерений можно использовать для выявления фазовых переходов в биоткани. Деление полученной с кожей температурной зависимости изменения отношения интенсивностей люминесценции (I_1) на зависимость, полученную без кожи (I_2) дает некий «коэффициент пропускания» кожи при регистрации в данном режиме (Рисунок 5.23).

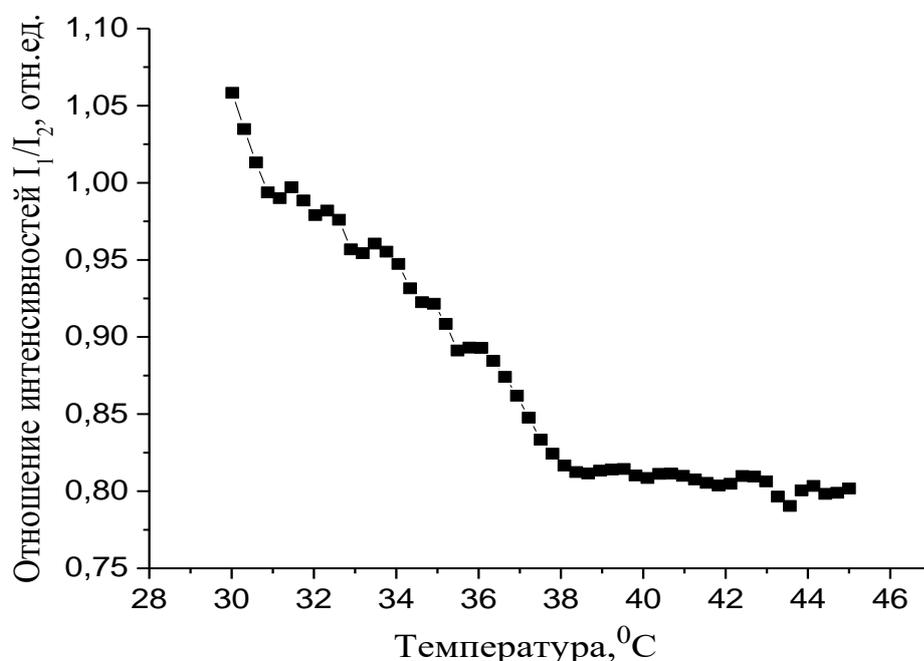


Рисунок 5.23 – Отношение температурной зависимости изменения отношения интенсивностей люминесценции с кожей на зависимость без кожи

Из полученного графика следует плавное изменение полученного параметра вплоть до температуры 38 °С, резкое изменение при данной температуре и постоянство его в дальнейшем. Таким образом, показано, что данный режим пригоден для выявления фазовых переходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, представленные в работе, заключаются в следующем:

1. Показано, что оптические свойства мышечной ткани изменяются при нагревании и различаются для комнатной и физиологической температур. При этом коэффициенты поглощения и рассеяния практически не изменяются. Основным параметром, изменяющимся при изменении температуры, является фактор анизотропии. Это изменение приводит также к изменению транспортного коэффициента рассеяния. При изменении температуры кожи напротив, фактор анизотропии изменяется слабо в отличие от коэффициента рассеяния.

2. Так же, из полученных результатов следует, что при прохождении света через эпидермис и дерму наблюдается различие коэффициентов поглощения. При увеличении температуры с комнатной до физиологической значительно растёт коэффициент поглощения при регистрации света со стороны эпидермиса.

3. Знание оптических и термических свойств тканей человека необходимо для оптимизации лазерной терапии и оптической диагностики. Известно, что оптические свойства биотканей зависят от температуры даже в физиологическом диапазоне температур, то есть в диапазоне нормального функционирования организма. Тем не менее, большинство исследований проводятся при комнатной температуре образца или вовсе без указания температуры. Таким образом, несомненно, возникает вероятность того, что использование литературных данных приведет к некорректной оценке условий распространения света через биологическую ткань в живом объекте и могут привести к недостоверным результатам при медицинской оптической диагностике или терапии. Поэтому исследования температурных зависимостей оптических свойств биологических объектов, несомненно, являются актуальными.

4. Кроме того, при исследовании кожи необходимо учитывать геометрию прохождения света через образец, а именно, как проводится регистрация спектров

при прохождении света: со стороны дермы или эпидермиса. Этот немаловажный факт необходимо обязательно упоминать в публикациях, иначе эксперименты не имеют практической значимости.

5. В результате исследований показано, что изменения спектральных характеристик кожи при сильном нагреве вызваны изменением светорассеяния в образце. Показано увеличение размеров рассеивателей при нагреве образцов, что приводит к изменению фактора анизотропии за счет коагуляции рассеивателей. Также сделан вывод об изменении показателя преломления коллагеновых волокон при нагревании.

6. Показано, что поддержание влажности позволяет исключить искажения спектров вследствие высыхания и повышенной коагуляции ткани при температурах вплоть до 45 °С.

7. При больших температурах и быстром нагреве происходит изменение состояния поверхностных слоев образца, что приводит к увеличению поглощения и рассеяния в нем.

8. Реализованные условия позволяют получить результаты, наиболее приближенные к результатам, ожидаемым при воздействии тепла или при лазерном нагреве *in vivo*.

9. Показано, что при прохождении света через кожу со стороны дермы ослабление света меньше, чем со стороны эпидермиса. Это может быть связано с тем, что рассеяние света в эпидермисе выше, чем в дерме. Соответственно, данный факт необходимо принимать во внимание при расчете коэффициентов ослабления люминесценции и коррекции спектров.

10. Охарактеризованы изменения спектральных характеристик биологических тканей крыс в результате термообработки при повышенных (> 40 °С) температурах при длительном (60 мин) и при ступенчатом нагреве.

11. Показано, что динамика изменения коллимированного пропускания кожи крысы зависит от температуры. При этом изменения происходят быстро и в основном в течение 3–5 минут заканчиваются. Последующие изменения более

плавные и незначительные. Наиболее резкие изменения происходят при температурах выше 45 °С. Нагрев образцов кожи крыс приводит к изменению коэффициента анизотропии за счет коагуляции коллагеновых волокон. Изменение кожного поглощения при нагревании начинается при температурах 60–70 °С в связи с большей термостабильностью кожи по сравнению с мышечной тканью.

12. Спектр поглощения преимущественно гемоглобина накладывается на спектр рассеяния мышечной ткани. Нагревание изменяет структуру гемоглобина, что влияет на динамику поглощения. Коагуляция тканей отсутствует при нагревании образцов мышечной ткани до заданной температуры при температуре до 60 °С. При 70 °С нагрев приводит к увеличению поглощения.

13. Фазовые переходы в жировой ткани происходят уже в процессе нагревания до заданной температуры. Степень коагуляции и, соответственно, коэффициент ослабления зависят от скорости нагрева и температуры. А именно, чем выше поднимается температура, тем больше у нас начальное значение коэффициента ослабления.

14. При регистрации внутренней температуры живого объекта при помощи люминесценции внедренных в него наночастиц существенным является геометрия расположения и угловая апертура сбора люминесценции, прошедшей через живую ткань. Минимальные искажения получаются при регистрации широкоапертурными приемниками, расположенными по нормали к поверхности ткани.

15. Показано, что регистрация отношения интенсивностей люминесценции внедренных в биоткань наночастиц $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ на полувысоте спектральной линии позволяет выявлять фазовые переходы в биоткани.

Представленные в данной диссертационной работе экспериментальные данные об изменении коэффициентов поглощения, рассеяния и фактора анизотропии кожи, подкожной жировой и мышечной тканей в широком диапазоне длин волн и температур необходимы для наиболее полного описания

оптических свойств многокомпонентных тканей, в частности, при исследованиях *in vivo*. Например, при решении прямой и обратной задач взаимодействия световых пучков со сложноорганизованными тканями с использованием статистического моделирования Монте-Карло. Также полученные результаты важны для усовершенствования и развития оптических методов диагностики и фототерапии социально-значимых заболеваний.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю профессору кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского, д.ф.-м.н. Вячеславу Ивановичу Кочубею за всестороннюю помощь, советы и поддержку при выполнении данной работы. Автор благодарит инженера кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского Анну Алексеевну Доронкину, младшего научного сотрудника кафедры квантовой электроники МГУ имени М.В. Ломоносова Казадаеву Наталью Игоревну, ассистента кафедры паталогической анатомии СГМУ им. В.И.Разумовского Мыльникову Артема Михайловича и руководителя центра коллективного пользования экспериментальной онкологии СГМУ им. В.И.Разумовского Аллу Борисовну Бучарскую за содействие в проведении экспериментальных исследований. Кроме того, автор благодарит всех сотрудников кафедры оптики и биотофоники за разностороннюю помощь при выполнении работы, а также семью и близких за поддержку, терпение и понимание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 M. Gautherie and C.M. Gros, “Breast Thermography and Cancer Risk Prediction,” *Cancer*, vol. 45, p. 51-56, 1980.
- 2 A. Gelet, “Treatment of prostate cancer with transrectal focused ultrasound: Early clinical experience,” *Eur Urol*, vol. 23, p. 174-183, 1996. DOI: 10.1117/12.148080
3. S.Jaywant, B.Wilson, M.Patterson, L.Lilge and T. Flotte, “Temperature-dependent changes in the optical absorption and scattering spectra of tissues: correlation with ultrastructure,” *Proc. SPIE. Laser-Tissue Interaction IV*, vol. 1882, 1993.
- 4 V. K. Nagarajan and B. Yu, “Monitoring of Tissue Optical Properties During Thermal Coagulation of *Ex Vivo* Tissues,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 48, p. 686–694, 2016. DOI: 10.1002/lsm.22541
- 5 H.L. Ao, D. Xing, H.J. Wei, H.M. Gu, G.Y. Wu and J.J. Lu, “Thermal coagulation-induced changes of the optical properties of normal and adenomatous human colon tissues *in vitro* in the spectral range 400–1100nm,” *Phys Med Biol.*, vol. 53, p. 2197–2206, 2008. DOI: 10.1088/0031-9155/53/8/013
- 6 T. L. Troy and S.N. Thennadil, “Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 6, Iss. 2, p. 167–176, 2001. DOI: 10.1117/1.1344191
- 7 J. Laufer, R. Simpson, M. Kohl and M. Cope, “Effect of temperature on the optical properties of *ex vivo* human dermis and subdermis,” *Phys. Med. Biol*, vol. 43, p. 2479–2489, 1998. DOI: 10.1088/0031-9155/43/9/004
- 8 T. L. Troy, D. L. Page and E. M. Sevick-Muraca, “Optical properties of normal and diseased breast tissues: prognosis for optical mammography,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 1, p. 342–355, 1996. DOI: 10.1117/12.239905
- 9 C. Gota, K. Okabe, T. Funatsu, Y. Harada and S. Uchiyama, “Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry,” *J Am Chem Soc*, no.131, p. 2766–2767, 2009.
- 10 J.-M. Yang, H. Yang and L. Lin, “Quantum Dot Nano Thermometers Reveal Heterogeneous Local Thermogenesis in Living Cells,” *Acs Nano*, no. 5(6), p. 5067-5071, 2011.
11. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. CIOMS and ICLAS. URL: <http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-research-involving-animals>. (дата обращения 24.06.2022)

- 12 С.Д. Гафуров, Ш.Ф. Юсуфов и С.С. Гафурова, «Воздействие лазерного излучения на живые биологические объекты,» *ENDLESS LIGHT IN SCIENCE*, с. 143-147, 2022.
- 13 О.Р. Шангина и Р.Д. Гайнутдинова, «Взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями,» *Практическая медицина*, т. 17, № 1, с. 24-27, 2019.
- 14 И. Карнейро, С. Карвалью, Р. Энрике, Л. Оливейра и В.Тучин, «Определение оптических свойств печени человека в диапазоне длин волн 400 – 1000 нм,» *Квантовая электроника*, т.49, № 1, с.13-19, 2019.
- 15 J.J. Xia, E.P. Berg, J.W. Lee and G. Yao, “Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS-NIR region,” *Meat Science*, no. 75, p. 78–83, 2007.
- 16 Alwin Kienle, Lothar Lilge, Michael S. Patterson, Raimund Hibst, Rudolf Steiner, and Brian C. Wilson, “Spatially resolved absolute diffuse reflectance measurements for noninvasive determination of the optical scattering and absorption coefficients of biological tissue,” *APPLIED OPTICS*, vol. 35, no. 13, p. 2304-2314, 1996.
- 17 А.П. Нечипоренко, С.М. Орехова, Л.В. Плотникова и П.П. Плотников, «Метод электронной спектроскопии диффузного отражения в исследовании мышечной ткани диких и домашних животных,» *ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ. ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ*, т. 9, н. 3, с. 489-499, 2019.
- 18 R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis and M.Cope, “Near-infrared optical properties of *ex vivo* human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique,» *Phys. Med. Biol.*, no. 43, p. 2465–2478, 1998.
- 19 B. Quistián-Vázquez, B. Morales-Cruzado, E. Sarmiento-Gómez and F.G. Pérez-Gutiérrez, “Retrieval of Absorption or Scattering Coefficient Spectrum (RASCS) Program: A Tool to Monitor Optical Properties in Real Time,» *Lasers Surg Med.*, no.52(6), p. 552-559, 2020.
- 20 J. Laufer, R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis and M.Cope, “Effect of temperature on the optical properties of *ex vivo* human dermis and subdermis,» *Phys. Med. Biol.*, vol. 43, p. 2479, 1998.
- 21 L.T. Troy, D.L. Page and E.M. Sevick-Muraca, “Optical properties of normal and diseased breast tissues: prognosis for optical mammography,» *J. Biomed. Opt.*, no. 1, p. 342–55, 1996.
- 22 R.N. Lewis, D.A. Mannock, R.N. McElhaney, P.T. Wong and H.H. Mantsch, “Physical properties of glycosyldiacylglycerols: an infrared spectroscopic study of the gel-phase polymorphism of 1; 2-Di-O-acyl-3-O-(α -D-glucopyranosyl)-sn-glycerols,» *Biochemistry*, no. 29, p.8933–43, 1990.

- 23 H.H. Mantsch, C. Madec, R.N. Lewis and R.N. McElhaney, "Thermotropic phase behaviour of model membranes composed of phosphatidylcholines containing dl-methyl anteisobranched fatty acids. 2. An infrared spectroscopy study," *Biochemistry*, no. 26, p. 4045–4049, 1987.
- 24 Raiyan T. Zaman, Narasimhan Rajaram, Alex Walsh, Jeffrey Oliver, Henry G. Rylander III, James W. Tunnell, Ashley J. Welch, and Anita Mahadevan-Jansen, "Variation of Fluorescence in Tissue with Temperature," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 43, p.36–42, 2011.
- 25 Yeh, Shu-Jen, Khalil, Omar, Hanna, Charles, Kantor, Stan, Wu and Xiaomao, "Temperature dependence of optical properties of in-vivo human skin," *Proc. SPIE 4250, Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue IV*, 2001.
- 26 Omar S. Khalil, Shu-Jen Yeh, Michael G. Lowery, Xiaomao Wu, Charles F. Hanna, Stanislaw Kantor, Tzyy-Wen Jeng, Johannes S. Kanger, Rene A. Bolt and Frits F de Mul, "Temperature modulation of the visible and near infrared absorption and scattering coefficients of human skin," *Journal of Biomedical Optics*, no. 8(2), p.191–205, 2003.
- 27 A.V. Belikov, C.V. Prikhodko and O.A. Smolyanskaya, "Study of thermo-induced changes resulted in optical properties of fat tissue," *Proc. of SPIE, Lasers for Measurements and Information Transfer*, vol. 5066, 2002.
28. S. H. Chung, A. E. Cerussi, S. I. Merritt, J. Ruth and B. J. Tromberg, "Non-invasive tissue temperature measurements based on quantitative DOS of water," *Phys. Med. Biol.*, vol. 55, p. 3753–3765, 2010. DOI:10.1088/0031-9155/55/13/012
29. J. R. Collins, "Change in the infra-red absorption spectrum of water with temperature," *Phys. Rev.*, vol. 26, p. 0771–0779, 1925. DOI: 10.1103/PhysRev.26.771
30. E. H Otal, F. A. Inon and F. J. Andrade, "Monitoring the temperature of dilute aqueous solutions using near-infrared water absorption," *Appl. Spectrosc.*, vol. 57, p. 661–6666, 2003. DOI: 10.1366/000370203322005355
- 31 Lise Lyngsnes Randeberg, Anre Johan Daae Hagen and Lars Othar Svaas, "Optical properties of human blood as a function of temperature," *Proc. SPIE, Lasers in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems XII*, vol. 4609, 2002.
- 32 V. Genin, E. Genina, A. Bucharskaya, V. Tuchin, and N. Khlebtsov, "Investigation of change of tumor optical properties after laser-induced plasmon-resonant photothermal treatment of transplanted tumors in rats," *PROCEEDINGS of SPIE*, vol. 10716, 2018.

- 33 S. Thomsen, S. Jacques and S. Flock, “Microscopic correlates of macroscopic optical property changes during thermal coagulation of myocardium,” *Proc Laser-Tissue Interaction*, vol. 1202, p. 2–11, 1990.
- 34 Jaywant, Satish, Wilson, Brian, Patterson, Michael, Lilge, Lothar, Flotte and Thomas, “Temperature-dependent changes in the optical absorption and scattering spectra of tissues: correlation with ultrastructure,” *Proc. SPIE Laser-Tissue Interaction IV*, vol. 1882, 1993.
- 35 S. M. Jaywant, B. C. Wilson, M. S. Patterson, L. D. Lilge, T. J. Flotte, J. Woolsey and C. McCulloch, “Temperature dependent changes in the optical absorption and scattering spectra of tissues: correlation with ultrastructure,” *Proc. SPIE*, p. 218–229, 1993.
- 36 Т.А. Картвелишвили, М.А. Кулюсов, И.О. Смирнов и М.В. Юмашев, «РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ТКАНЯМИ,» *СБОРНИК ТЕЗИСОВ LXIV Международной конференции «Актуальные проблемы прочности»*, стр. 389-391, 2022.
- 37 Э.Х. Исрапов, К.М. Гираев, М.А. Магомедов и Н.А. Ашурбеков, «Численное моделирование пространственного распределения температуры в биотканях по мере их лазерного нагрева,» *Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1. Естественные науки*, т. 33, вып. 2. с.28-37, 2018.
- 38 И.В. Куликова, С.П. Малюков и С.А. Бростилов, «МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕПЛООВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТКАНИ,» *ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ*, №11, с. 425-429, 2012.
- 39 A. M. Sagi-Dolev, Avraham Shitzer, Abraham Katzir, and Solange Akselrod, “Heating of biological tissue by laser irradiation: theoretical model,” *Optical Engineering*, vol. 31(7), 1992.
- 40 S. Rastegar, B. Kim, and Steven L. Jacques, “Role of temperature dependence of optical properties in laser irradiation of biological tissue,” *Proc. SPIE 1646, Laser-Tissue Interaction III*, 1992.
- 41 Youwu He and Hui Li, “Study the effect of temperature on optical properties of biological tissue-simulating phantom based on OCT,” *Proc. SPIE 8553, Optics in Health Care and Biomedical Optics*, v, 85532, 2012.
- 42 A. Ghita, P. Matousenk and N. Stone, “Sensitivity of Transmission Raman Spectroscopy Signals to Temperature of Biological Tissues,” *Scientific reports*, p.8379, 2018.
- 43 S. Rastegar, M. Motamedi, A. J. Welch, and U. A Hayes, “Theoretical Study of the Effect of Optical Properties in Laser Ablation of Biological Tissue,” *IEEE Trans Biomed Eng.*, vol.36, no.12, 1989.

- 44 Cilesiz and meci Fatma, "The effects of dehydration and thermal damage on the optical properties of biological tissues," *M.S. Thesis, University of Texas, Austin, Texas*, 1990.
- 45 E. Salomatina, and A. Yaroslavsky, "Evaluation of the *in vivo* and *ex vivo* optical properties in a mouse ear model," *Physics in medicine and biology*, vol. 53, p. 2797-807, 2008.
- 46 В.В. Тучин, «Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике,» *М.: ФИЗМАТЛИТ*, с.812, 2013.
- 47 И. Ю. Янина, Е. К. Волкова, Е. А. Сагайдачная, В. И. Кочубей и В.В. Тучин, «Влияние рассеяния света на определение температуры биологической ткани по спектрам фотолюминесценции ап-конверсионных наночастиц,» *Квантовая электроника*, т. 49, №. 1, с. 59-62, 2019.
- 48 I. Yu. Yanina, A. A. Skaptsov, Ju. G. Konyukhova, N. I. Kazadaeva, E. A. Sagaidachnaya, A. A. Doronkina, A. B. Pravdin, and V. I. Kochubey, "Temperature dependencies of the spectral characteristics of the skin," *Proc. SPIE 11457, Saratov Fall Meeting 2019: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine*, p. 114570E, 2020.
- 49 I. Yu. Yanina, A. A. Skaptsov, J. G. Konyukhova, N. I. Kazadaeva, E. A. Sagaidachnaya, A. A. Doronkina, A. B. Pravdin and V. I. Kochubey, "Temperature-stimulated changes in the spectral characteristics of biological tissues," *Proc.SPIE 11363, Tissue Optics and Photonics*, p.113631, 2020.
- 50 C. J. Gordon, "Temperature regulation in laboratory rodents," *N-Y.: Cambridge University Press*, p. 276, 1993.
- 51 И.П. Западнюк, В.И. Заниднюк, Е.А. Захария и Б.В. Западнюк, «Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте,» *Б.В. – Киев: Вища школа. Головное изд-во*, с. 383, 1983.
52. Inverse Adding-Doubling. URL: <https://omlc.org/software/iad/index.html> (дата обращения 24.06.2022)
- 53 A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V.I. Kochubey and V.V. Tuchin, "Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm," *Journal of Physics, D, Applied Physics*, 38, 2543-2555, 2005.
- 54 Э.А. Генина, А.Н. Башкатов, В.И. Кочубей и В.В Тучин, «Влияние условий хранения образцов кожи на их оптические характеристики,» *Оптика и спектроскопия*, т. 107, № 6, с. 986-991, 2009.

- 55 А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, В.И. Кочубей и В.В. Тучин, «Оптические свойства подкожной жировой ткани в спектральном диапазоне 400-2500 нм,» *Оптика и спектроскопия*, т. 99, № 5, с. 868-874, 2005.
- 56 A.N. Bashkatov, E.A. Genina, I.V. Korovina, V.I. Kochubey, Yu.P. Sinichkin and V.V. Tuchin, “*In vivo* and *in vitro* study of control of rat skin optical properties by acting of osmotical liquid,” *Proc. SPIE*, vol. 4224, p. 300-311, 2000. DOI: 10.1117/12.403935
- 57 S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: a review,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, p. 37–61, 2013.
- 58 A. N. Bashkatov, E. A. Genina and M. D. Kozintseva, “Optical Properties of Peritoneal Biological Tissues in the Spectral Range of 350–2500 nm,” *Optics and Spectroscopy*, vol. 120(1), p. 1-8, 2016.
- 59 A. N. Bashkatov, E. A. Genina and V.I. Kochubey, “Optical properties of human stomach mucosa in the spectral range from 400 to 2000 nm: Prognosis for gastroenterology,” *Medical Laser Application*, vol. 22, p.95-104, 2007.
- 60 R. K. Wang, “Modelling Optical Properties of Soft Tissue by Fractal Distribution of Scatters,” *J. Mod. Opt.*, vol. 47, p. 103-120, 2000.
- 61 Y Xia and N.J. Halas, “Shaped Controlled Synthesis and Surface Plasmonic Properties of Metallic Nanostructures,” *MRS Bull.*, vol. 30, p. 338-348, 2005.
- 62 J.L. West and N.J. Halas, “Engineered materials for biophotonics applications: improving sensing, and therapeutics,” *Annu Rev. Biomed Eng.*, vol. 5, p. 285-292, 2004.
- 63 С.Н. Мустафаева, М.М. Асадов, Д.Т. Гусейнов и И. Касымоглу, «ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНОКРИСТАЛЛА CuInS_2 В ПЕРЕМЕННЫХ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛЯХ РАДИОЧАСТОТНОГО ДИАПАЗОНА,» *Физика и техника полупроводников*, т. 57(6), с.1079-1083, 2015.
- 64 J. Kolny-Olesiak and H. Weller, “Synthesis and Application of Colloidal CuInS_2 Semiconductor Nanocrystals,” *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, vol. 5, p. 12221–12237, 2013.
- 65 T. Pons, E. Pic, N. Lequeux, E. Cassette, L. Bezdetnaya, F. Guillemin, F. Marchal and B. Dubertret, “Cadmium-free $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ quantum dots for sentinel lymph node imaging with reduced toxicity,” *Molecules*, vol. 22(12), 2017.
- 66 Jianbing Zhang, “One-pot synthesis of hydrophilic CuInS_2 and $\text{CuInS}_2\text{-ZnS}$ colloidal quantum dots,” *Journal of Material Chemistry*, p. 4812-4817, 2014.