

Исследование оптических свойств плазмы крови мышей с карциномой Эрлиха в диапазоне частот 0.1–1.0 ТГц*

О.А.Смолянская, О.В.Кравченко, А.В.Панченко,
Е.Л.Одьяницкий, Ж.П.Гийе, О.П.Черкасова, М.К.Ходзицкий

В ходе in vitro исследования крови лабораторных животных с развивающейся карциномой Эрлиха выявлено изменение оптических свойств плазмы крови в терагерцевом диапазоне частот, что может быть использовано для разработки экспресс-диагностики наличия онкологических заболеваний. Разработан пакет прикладных программ, позволяющий численно моделировать фантомы биологических образцов сложной структуры, а также рассчитывать параметры отраженной от этих фантомов электромагнитной волны терагерцевого диапазона частот.

Ключевые слова: терагерцевая спектроскопия с разрешением во времени (THz TDS), опухоль Эрлиха, SHR линия мышей, плазма крови, метод конечных разностей во временной области.

1. Введение

Лабораторная диагностика опухолей основана на выявлении связанных с опухолью маркеров, обнаруживаемых в злокачественных клетках и ассоциированных с их ростом. Это макромолекулы, различающиеся качественно (опухолеспецифичные) или количественно (ассоциированные с опухолью, но присутствующие также и в нормальных клетках). Часть онкомаркеров секретируется в кровь, благодаря чему их концентрацию можно определить в плазме крови. Известны около двухсот соединений, ассоциированных с различными локализациями рака, однако диагностическую значимость имеют лишь около двух десятков белков [1, 2]. Не существует онкомаркеров с абсолютной специфичностью (которые не должны выявляться у здоровых людей и при доброкачественных новообразованиях) и чувствительностью (выявляются обязательно при наличии заболевания и на его ранних стадиях). Разработка новых диагностических методов и повышение чувствительности выявления онкологических заболеваний на ранних стадиях является актуальной задачей клинической медицины.

Развитие в последнее десятилетие методов генерации и детектирования терагерцевого излучения привело к значительным успехам в применении терагерцевой им-

пульсной спектроскопии для исследования медицинских и биологических объектов [3]. Данный метод позволяет определять дисперсию показателя преломления и коэффициента поглощения образца за одно измерение, что в перспективе даст возможность развития на этой основе экспресс-диагностики. Применяя данный метод, можно также получить дисперсию комплексной диэлектрической проницаемости исследуемого образца.

Основная часть поглощенного живыми тканями терагерцевого излучения приходится на молекулы воды [4, 5]. Это происходит вследствие того, что молекулы воды образуют максимальное количество водородных связей как между собой, так и с многочисленными растворенными и гидратированными соединениями. В результате образуются сложные динамические цепочки и сети из диполей, которые сообщают колебания макроскопической сети дипольных молекул воды обладают собственным вращательно-колебательным спектром в терагерцевом диапазоне частот [5]. Кроме того, медленная релаксация больших агрегаций, которые молекулы воды образуют с помощью водородных связей, обуславливает сильные межмолекулярные колебания с частотой ~ 1.5 ТГц [5]. Все это делает водную среду наиболее эффективным хромофором для терагерцевого излучения.

Терагерцевая импульсная спектроскопия была успешно использована для диагностики онкологической патологии ряда органов и тканей [6–11]. Было показано, что оптические характеристики патологической и здоровой тканей существенно различаются в терагерцевом диапазоне частот. Методами терагерцевой импульсной спектроскопии уже исследовалась кровь доноров [12, 13], а также животных [14]. Выявлено существование измеримых различий в показателях преломления и коэффициентах поглощения цельной крови и ее компонентов. Эффект был наиболее выражен для тромбоцитов [12] и эритроцитов [13]. Зафиксирована линейная зависимость коэффициента поглощения образца от концентрации эритроцитов в крови [13, 14]. Авторы высказали предположение о возможности использования метода терагерцевой импульсной спектроскопии для определения гематокрита.

* Доложена на Международном симпозиуме «Фундаментальные основы лазерных микро- и нанотехнологий» (FLAMN-16) (Ленинградская обл., Пушкин, 27 июня–1 июля 2016 г.).

О.А.Смолянская, О.В.Кравченко, Е.Л.Одьяницкий, М.К.Ходзицкий. Университет ИТМО, Россия, 197101 С.-Петербург, Кронверкский просп., 49;
e-mail: smolyanskaya@corp.ifmo.ru; khodzitskiy@yandex.ru
А.В.Панченко. НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова Минздрава РФ, Россия, 197758 С.-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68
J.P.Guillet. Bordeaux University, IMS, UMR CNRS 5218, 351 Cours de la libération 33405 Talence, France
О.П.Черкасова. Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 13/3

Поступила в редакцию 24 марта 2017 г., после доработки – 18 сентября 2017 г.

Была показана применимость импульсной терагерцевой спектроскопии для исследования плазмы крови при ряде патологий. Так, наблюдалась отрицательная корреляция между коэффициентом поглощения терагерцевого излучения и количеством эритроцитов и триглицеридов в крови пациентов кардиохирургического отделения [15]. Выявлено, что значительное изменение состава плазмы крови при экспериментальном диабете [16] оказывает влияние на изменения показателя преломления и коэффициента поглощения плазмы крови, причем эти изменения наиболее выражены при осложненном диабете [17, 18]. В работе [19] сообщается, что клеточные линии лейкоза HL60 и THP1 различаются увеличенным в несколько раз по сравнению с нормальными клетками фактором анизотропии рассеяния и коэффициентом поглощения терагерцевого излучения.

Таким образом, анализ литературы показывает, что такие компоненты крови, как эритроциты и тромбоциты, а также ряд метаболитов вносят определенный вклад в поглощение крови в терагерцевом диапазоне частот. Однако работы по применению терагерцевой импульсной спектроскопии для исследования крови и ее компонентов при развитии онкологических заболеваний нами не обнаружены. В настоящей работе проведены экспериментальные исследования и численное моделирование с целью определения наиболее чувствительного объекта для диагностики онкологических заболеваний в терагерцевом диапазоне частот.

Мы экспериментально исследовали спектры отражения цельной крови, плазмы крови и взвеси опухолевых клеток Эрлиха. Были получены дисперсии комплексных диэлектрических проницаемостей для перечисленных образцов. Измерения проведены в диапазоне частот 0.1–1.0 ТГц для контрольной группы мышей линии SHR и таких же мышей с перевитой опухолью Эрлиха, которая является удобной и хорошо изученной моделью злокачественного новообразования [20]. Проводилась также патоморфологическая оценка подопытных животных для исключения сопутствующих заболеваний, которые могли оказать влияние на исследуемые параметры.

Мы провели моделирование фантома биологического образца сложной структуры с последующим численным моделированием процесса его взаимодействия с терагерцевым излучением и определением его оптических характеристик.

Основным объектом исследования в настоящей работе была плазма крови. Это желтоватая жидкость, получаемая после отделения от крови форменных элементов и состоящая из воды (90%) и растворимых веществ (10%), включая белки (7%–8%), в частности альбумины, глобулины, факторы свертывания, а также органические и минеральные соединения [21]. Кроме того, в плазме крови растворены питательные вещества (глюкоза, липиды), гормоны, витамины, ферменты, промежуточные и конечные продукты обмена веществ, а также неорганические вещества. В зависимости от способа получения экспериментальный образец плазмы крови может содержать тромбоциты в различном соотношении [22], выделяемые из клеток внеклеточные пузырьки диаметром от 30 нм до 5 мкм [23], циркулирующие молекулы микро-РНК [25]. Также мы исследовали взвесь опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl (физиологический раствор). В данной взвеси содержатся в основном клетки опухоли размером 14–20 мкм, но могут присутствовать в небольшом коли-

честве и другие клетки (например, лимфоциты). Следует отметить, что размеры форменных элементов крови, компонентов плазмы крови и опухолевой взвеси (30 нм–20 мкм) намного меньше длины волны падающего терагерцевого излучения (300 мкм – 3 мм).

2. Пробоподготовка объекта исследования

Работа была проведена на 9 мышках-самцах (доноры) и 10 мышках-самках (опытная группа) трехмесячного возраста аутбредной линии SHR с массой тела 25–30 г собственного разведения (НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова, Санкт-Петербург). Животные содержались в стандартных клетках типа Т2 в вентилируемом помещении вивария при стандартном режиме освещения и температуре 18–22°C; они получали стандартный лабораторный корм ПК120 («Лабораторкорм», Москва) и водопроводную воду *ad libitum*.

В работе был использован штамм перевиваемой карциномы Эрлиха мышей (НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова) в виде асцитной формы рака, представляющей собой суспензию опухолевых клеток в брюшной полости. Кривая роста опухоли [20] и фотография мыши на 14-е сутки развития опухоли представлены на рис.1. Данная опухоль растет в виде узла.

Исходно мы получали асцитическую жидкость у мышей-доноров в концентрации 5×10^6 опухолевых клеток на 1 мл и далее использовали ее для приготовления взвеси опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl для исследования в терагерцевом диапазоне и для введения подкожно мышам (0.2 мл взвеси опухолевых клеток в физиологическом растворе, 10^6 опухолевых клеток на мышью) для развития у них перевитой узловой опухоли (рис.1,б).

Взвесь опухолевых клеток готовили добавлением к асцитической жидкости физиологического раствора в соот-

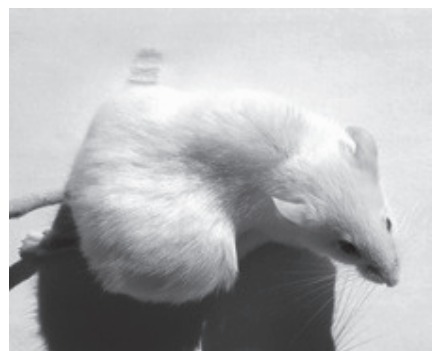
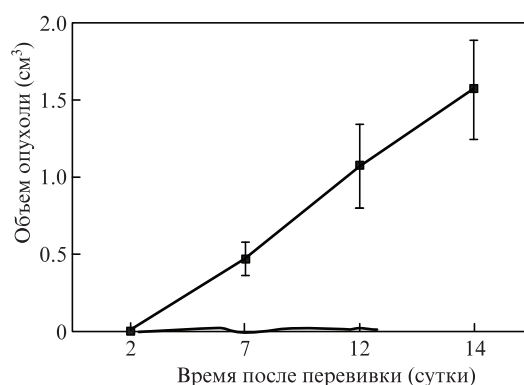


Рис.1. Кривая роста подкожной опухоли Эрлиха (а) и фотография мыши с крупным опухолевым узлом (б).

ношении 1:1 с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об./мин. Осадок ресуспендировали в этом же растворе и центрифугировали повторно, снова ресуспендировали осадок и после этого проводили подсчет концентрации клеток в камере Горяева по общепринятой методике [24].

Оценка опухолевого роста (рис.1,а) проводилась по стандартной методике: измеряли длину и ширину опухолевых узлов и объем опухоли рассчитывали по формуле эллипсоида

$$V = ab^2/2, \quad (1)$$

где a – наибольший продольный (длина), b – наибольший поперечный (ширина) линейные размеры опухолевого узла.

В конце опыта (на 14-е сутки после перевивки опухоли) проводили патоморфологическое исследование подопытных животных с макроскопической оценкой внутренних органов для исключения сопутствующих заболеваний, которые могли бы оказать влияние на исследуемые параметры.

В работе использовали цельную кровь и плазму крови, которую получали после центрифугирования цельной крови в течение 5 мин при скорости 1500 об./мин. Кровь из кончика хвоста собирали в пробирки с K_2EDTA . Общий анализ крови выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray 2800Vet (Китай). Время от момента взятия крови до проведения гематологического анализа составляло один час. Затем пробы крови перевозились в пластиковом контейнере с хладагентом комнатной температуры для проведения спектроскопических исследований. Время от момента взятия образца у мышей-доноров до начала его исследования на терагерцевом спектрометре составляло около трех часов, а до окончания измерения (12 пробирок) – восемь часов. В течение этого времени образцы крови находились в тех же пробирках, в которые они были собраны.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6» (Statsoft, США). Результаты оценивали с использованием t -критерия Стьюдента. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при уровне значимости 5%. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – среднеарифметическое отклонение.

3. Установка для терагерцевой спектроскопии с разрешением по времени

Серия экспериментов проводилась с использованием установки, генерирующей широкополосное терагерцевое импульсное излучение при воздействии на нелегированный кристалл арсенида индия [26, 27], находящийся в постоянном магнитном поле 2.4 Тл [28], фемтосекундными импульсами лазера FL-1 (активная среда Yb:KYW, $\lambda = 1040$ нм, $t_{p1} = 46$ фс, $f = 70$ МГц, $P \geq 1$ Вт). Генерируемое излучение проходит через фильтр из тефлона, который отсекает длины волн короче 50 мкм, и далее падает на образец. Образец зафиксирован в плоскости, перпендикулярной оптической оси, при прохождении сквозь него терагерцевое излучение претерпевает дифракцию. Электрооптическое детектирование осуществляется с помощью четвертьволновой пластины, призмы Волластона, балансного фотодетектора и синхронного усилителя [29]. От-

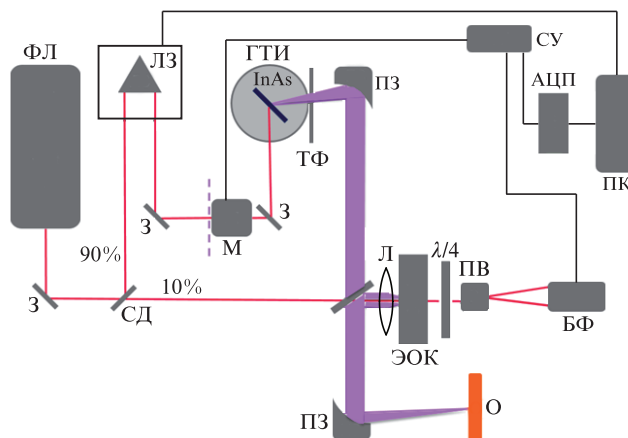


Рис.2. Схема импульсного терагерцевого спектрометра:

ФЛ – фемтосекундный лазер FL-1; З – зеркало; СД – светоделитель; ЛЗ – оптическая линия задержки; М – механический модулятор; ГТИ – генератор терагерцевого излучения; ТФ – тефлоновый фильтр; ПЗ – параболическое зеркало; Л – линза из пластика ТРХ; ЭОК – электрооптический кристалл CdTe; ПВ – призма Волластона; БФ – балансный фотодетектор; СУ – синхронный усилитель; АЦП – аналого-цифровой преобразователь; О – объект исследования.

фильтрованный и усиленный сигнал передается на компьютер через АЦП. Погрешность определения частоты при измерениях составляет ~ 10 ГГц для режима на пропускание и 15 ГГц для режима на отражение терагерцевого излучения [30]. Управление установкой реализовано в программной среде NI LabVIEW, посредством которой контролируются временная задержка пробного фемтосекундного импульса и процесс измерения, а также осуществляется регистрация временной формы терагерцевого импульса.

Схема универсального импульсного терагерцевого спектрометра представлена на рис.2 [31]. Используемое в данной экспериментальной установке терагерцевое излучение имеет следующие параметры: спектральный диапазон 0.1–2.0 ТГц, средняя мощность ~ 0.3 мкВт, длительность импульса 2.7 пс. Большая часть энергии заключена в интервале 0.1–0.6 ТГц с максимумом вблизи 0.2 ТГц (рис.3,б).

Метод проведения измерений на отражение был предложен в работе [31]. Если импульсное терагерцевое излучение отражается от кремниевой пластины и образца на подложке (рис.4), то фотоприемник зарегистрирует как импульс излучения, отраженного от кремниевой пластины, так и как задержанный импульс излучения, отраженного от границы раздела кремниевая пластина–образец.

Терагерцевое поле регистрируется как функция временной задержки зондирующего импульса (рис.3). Преобразование Фурье от поля терагерцевого импульса позволяет получить его частотный спектр:

$$\tilde{E}(\omega) = A(\omega) \exp[-i\varphi(\omega)] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dt E(t) \exp(-i\omega t), \quad (2)$$

где $\tilde{E}(\omega)$ – комплексная амплитуда сигнала; $A(\omega)$ – амплитуда комплексной амплитуды сигнала; $\varphi(\omega)$ – фаза комплексной амплитуды сигнала. Регистрируя поле терагерцевого импульса после его взаимодействия с объектом исследования и затем вычисляя спектр по формуле (2), можно получить спектральную характеристику этого объекта в диапазоне частот, присутствующих в спектре им-

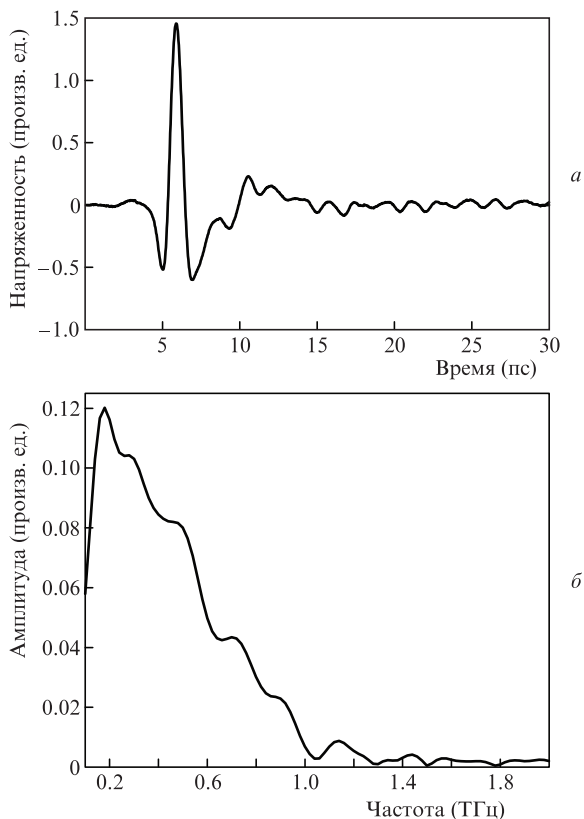


Рис.3. Электрическое поле терагерцевого импульса (а) и его частотный спектр (б) при распространении терагерцевого импульса в воздухе.

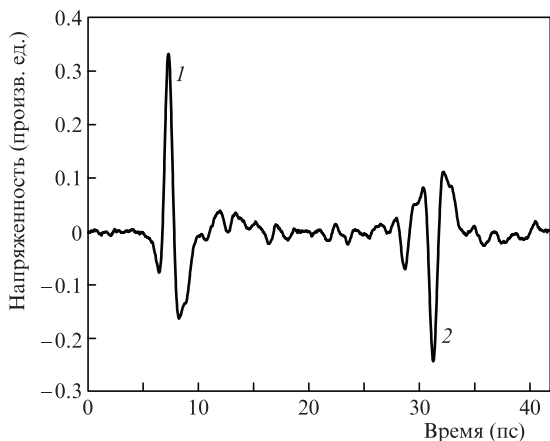


Рис.4. Электрическое поле терагерцевого импульса при его отражении от первой поверхности кремниевой пластины (1) и от границы кремниевая пластина–образец (2).

пульса. В связи с тем, что получение спектра происходит путем регистрации поля (осциллограммы) импульса, данный метод получил название терагерцевой спектроскопии во временной области (Terahertz Time-Domain Spectroscopy, THz TDS). Терагерцевый импульс обычно содержит всего несколько осцилляций поля, поэтому его спектр может простирается более чем на октаву.

При прохождении импульса через жидкий биологический образец его амплитуда уменьшается, а временная форма и поляризация могут измениться. Поскольку вода является негиротропным объектом, а исследуемые в настоящей работе объекты содержат в основном воду, то в дальнейшем мы считали, что исследуемые образцы неги-

ротропны и не изменяют состояния поляризации исходного терагерцевого импульса.

4. Методика измерения оптических свойств образца крови и ее компонентов с использованием импульсного терагерцевого спектрометра

Для исследования оптических характеристик крови и ее компонентов с использованием импульсного терагерцевого спектрометра нами была разработана методика анализа жидкого образца (кровь, плазма крови, взвесь опухолевых клеток) в режиме на отражение. Образец крови или плазмы крови не разбавлялся. Его объем, который составлял 20 мкл, отмеряли микродозатором после тщательного перемешивания пробы крови в течение трех минут путем переворачивания пробирки. После этого образец помещался между пластиковой и кремниевой (толщиной 1.04 мм с $n_{Si} = 3.4$) пластинами (рис.5), благодаря чему образец во время проведения измерений не подсыхал. Время диагностики одной пробы составляло 2–3 мин.

Покровная кремниевая пластина, не подвергаемая дополнительной компрессии, используется в эксперименте по следующим причинам: во-первых, биологические образцы, тем более жидкие, имеют разную толщину в каждой точке поверхности, и ее трудно точно измерить, а неплоская внешняя поверхность смещает угол отражения излучения относительно предусмотренного оптической схемой экспериментальной установки; во-вторых, жидкий объект высыхает, и это может оказать существенное влияние на его спектральные свойства.

Для нахождения показателя преломления биологического объекта, расположенного под кремниевой пластиной, требуется измерить ее показатель преломления n_{Si} и толщину d_{Si} .

Измерение изменений фазы и частоты временной формы терагерцевого импульса позволяет определить диэлектрическую постоянную исследуемого образца. Отношение фурье-преобразований объектного ($\hat{E}_s(v)$) и опорного ($\hat{E}_r(v)$) сигналов таково:

$$\frac{\hat{E}_s(v)}{\hat{E}_r(v)} = \frac{t_{aSi} \hat{r}_{SiSam} t_{SiA}}{r_{aSi}} \exp\left(i \frac{4\pi n_{Si} d_{Si} v}{c}\right), \tag{3}$$

где t_{aSi} , t_{SiA} , r_{aSi} и \hat{r}_{SiSam} – коэффициенты Френеля для пропускания (t) и отражения (r) излучения при нормальном угле падения. Индексы определяют границы раздела воздуха (a), кремния (Si) и образца (sam). Коэффициенты Френеля для границы раздела воздух–кремний являются

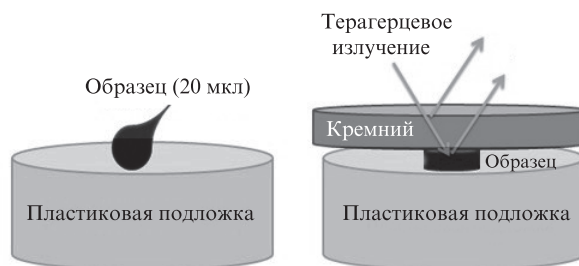


Рис.5. Методика подготовки образца крови для исследования в терагерцевом спектрометре.

действительными, поскольку принимается, что сухой воздух и кремний не поглощают излучение. Экспонента определяет фазовый сдвиг излучения при распространении в кремниевой пластине. При нормальном падении излучения на образец комплексный коэффициент отражения Френеля на границе кремний–образец представляется в следующем виде:

$$\hat{r}_{\text{SiSam}} = \frac{n_{\text{Si}} - \hat{n}_{\text{sam}}}{n_{\text{Si}} + \hat{n}_{\text{sam}}}, \quad (4)$$

где $\hat{n}_{\text{sam}} = n_{\text{sam}} + i\alpha_{\text{sam}}c/(4\pi\nu)$ – комплексный показатель преломления образца. Выразив коэффициент отражения по формуле Эйлера, $\hat{r}_{\text{SiSam}} = R \exp(i\theta)$, и решив уравнение (4) для неизвестных показателей преломления (n_{sam}) и поглощения (α_{sam}) образца, получим

$$n_{\text{sam}} = \frac{n_{\text{Si}}(1 - R^2)}{1 + R^2 + 2R \cos \theta}, \quad (5)$$

$$\alpha_{\text{sam}} = \frac{4\pi n_{\text{Si}} \nu}{c} \frac{-2R \sin \theta}{1 + 2R^2 + 2R \cos \theta}. \quad (6)$$

Поскольку для кремниевой пластины нам известны как n_{Si} , так и d_{Si} , амплитуду R и угол фазы θ можно определить из экспериментальных данных, если выделить из уравнения (3) величину $\hat{r}_{\text{SiSam}} = R \exp(i\theta)$. Действительная и мнимая части диэлектрической постоянной $\hat{\epsilon} = \epsilon' + i\epsilon''$ вычисляются из соотношения $\hat{\epsilon} = \hat{n}^2$.

Очевидно, что оптические постоянные образцов, полученные из уравнений (5) и (6), сильно зависят от точности измерения n_{Si} и d_{Si} , поэтому перед каждой серией экспериментов проводится калибровочное измерение для определения характеристик кремниевой пластины.

Отношение фурье-преобразований полей импульсов излучения, отраженного от границы воздух–кремний, $\hat{E}_{\text{aSi}}(\nu)$, и излучения, отраженного от границы кремний–воздух, $\hat{E}_{\text{SiA}}(\nu)$, дает нам возможность определить показатели преломления воздуха и кремния, пользуясь выражением, аналогичным уравнению (3):

$$\frac{\hat{E}_{\text{SiA}}(\nu)}{\hat{E}_{\text{aSi}}(\nu)} = \frac{t_{\text{aSi}} r_{\text{SiA}} t_{\text{SiA}}}{r_{\text{aSi}}} \exp\left(i \frac{4\pi n_{\text{Si}} d_{\text{Si}} \nu}{c}\right), \quad (7)$$

где действительные коэффициенты Френеля для пропускания и отражения t_{aSi} , t_{SiA} , r_{aSi} и t_{SiSam} зависят только от n_{Si} и n_{a} (показатель преломления воздуха) при нормальном падении излучения. Если мы выразим $\hat{E}_{\text{SiA}}(\nu)/\hat{E}_{\text{aSi}}(\nu)$ как $R_{\text{SiA}} \exp(i\theta_{\text{SiA}})$ и воспользуемся тем, что $r_{\text{SiA}}/r_{\text{aSi}} = -1 = \exp(i\pi)$ при нормальном падении излучения, неизвестный показатель преломления n_{Si} может быть вычислен из фазовой части уравнения (7):

$$n_{\text{Si}} = \frac{(\theta_{\text{SiA}} - \pi)c}{4\pi d_{\text{Si}} \nu}, \quad (8)$$

амплитудная часть уравнения (7) даст нам

$$n_{\text{Si}} = \frac{2 - R_{\text{SiA}} + 2\sqrt{1 - R_{\text{SiA}}}}{R_{\text{SiA}}} n_{\text{a}}. \quad (9)$$

Таким образом, мы получаем два уравнения, (8) и (9), с двумя неизвестными – n_{Si} и d_{Si} , что позволяет вычислить их с помощью лишь одного измерения.

5. Экспериментальные результаты и их обсуждение

В нашей работе [32] было показано, что терагерцевые спектры отражения цельной крови у аутбредных самцов и самок мышей-альбиносов линии SHR совпадают. При гематологическом исследовании у самок мышей наблюдалось меньшее абсолютное и относительное содержание гранулоцитов, несколько выше было содержание лимфоцитов, однако данные отличия по гематологическим показателям белых клеток крови (лейкоциты) не оказали влияния на спектральные характеристики цельной крови. В [32] нами также было исследовано влияние разных стадий развития онкологического процесса и хронического воспаления на спектральные характеристики цельной крови и показано, что в диапазоне частот 0.1–1.0 ТГц нет достоверных различий в коэффициентах поглощения и показателях преломления образцов цельной крови животных контрольной группы и животных с исследованными патологиями. В настоящей работе мы провели сравнительный анализ спектров отражения цельной крови, плазмы крови и взвеси клеток карциномы Эрлиха. На рис.6 приведены дисперсии показателей преломления и поглощения, а также дисперсии действительной и мнимой частей диэлектрической проницаемости цельной крови и плазмы крови для контрольной группы животных и животных с карциномой Эрлиха (онкологическая группа) на 14-е сутки после перевивки опухоли.

В диапазоне частот 0.5–0.6 ТГц показатель преломления цельной крови животных контрольной группы составляет ~ 2.09 , онкологической – 2.00. При этом для плазмы крови животных контрольной группы этот показатель равен 2.20, а онкологической группы – 2.10 в диапазоне больших частот (0.7–0.8 ТГц). В области частот 0.6–0.8 ТГц показатель поглощения плазмы крови мыши из контрольной группы превышает этот показатель плазмы крови животного с карциномой Эрлиха в среднем на 17%–23%. Увеличение показателя поглощения плазмы крови животных в диапазоне частот 0.7–0.8 ТГц может быть связано с поглощением воды на частоте 0.75 ТГц, отмеченным в работе [33]. Сравнение значений ϵ' цельной крови животных контрольной и онкологической групп (рис.6,в) показало, что наибольшее различие имеет место в диапазоне частот 0.5–0.7 ТГц. Например, на частоте 0.6 ТГц значение ϵ' для цельной крови животных контрольной группы составляет ~ 3.20 , а для онкологической группы оно равно ~ 2.45 . Различия в значениях ϵ' для плазмы животных контрольной и онкологической групп максимальны в диапазоне 0.55–0.75 ТГц. В данном диапазоне частот действительная часть диэлектрической проницаемости плазмы животного с карциномой Эрлиха превышает ϵ' мыши из контрольной группы на 17%–39%. Значения мнимых частей диэлектрической проницаемости ϵ'' для цельной крови обеих групп достаточно близки. В то же время при сравнении значений ϵ'' для плазмы крови животных наблюдаются их различия в диапазонах 0.3–0.4 и 0.6–0.8 ТГц. Например, на частоте 0.7 ТГц значение ϵ'' для плазмы животных контрольной группы составляет 6.60, а для онкологической группы оно равно ~ 5.35 .

В работе [34] методом динамического рассеяния света в разбавленных препаратах плазмы крови лабораторных животных, описанных в настоящей статье, была сделана оценка функции распределения компонентов по разме-

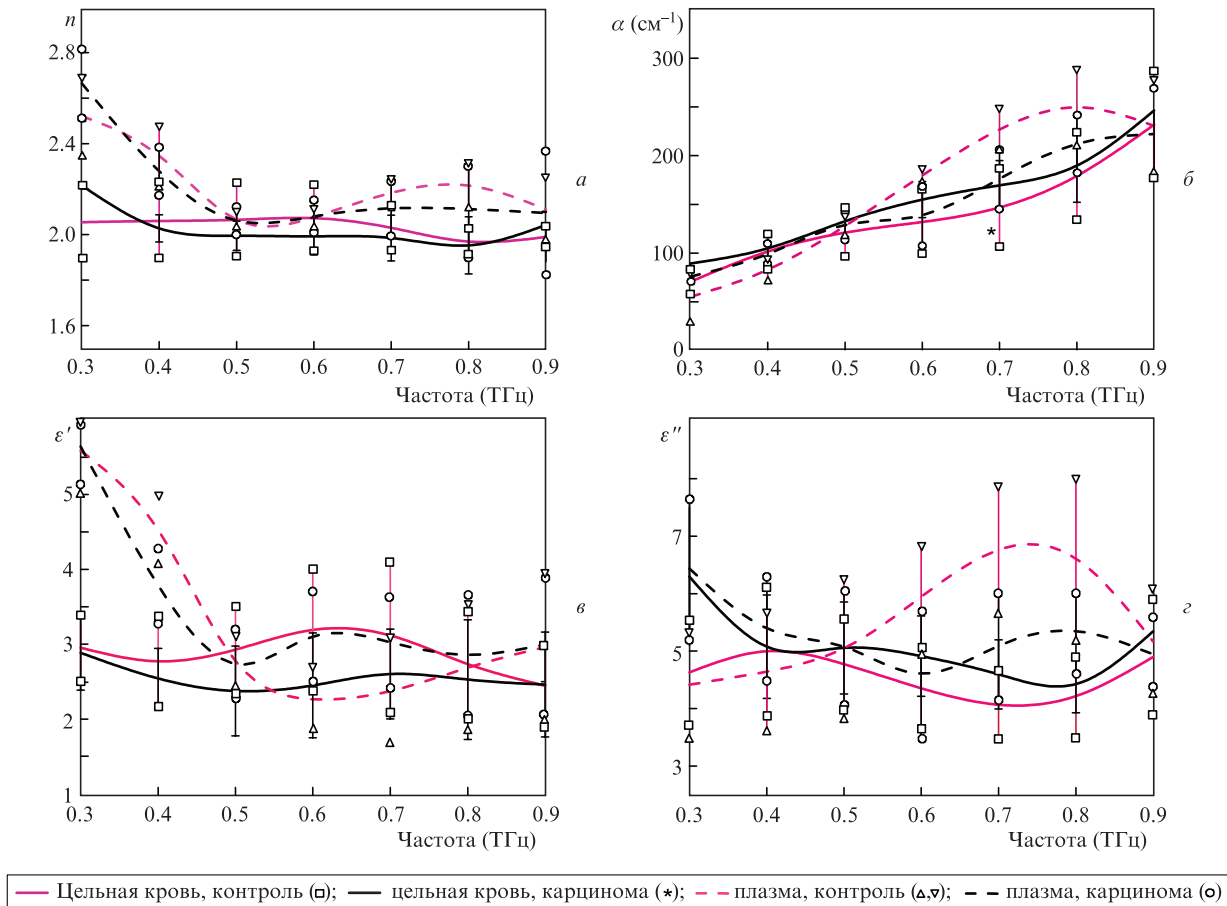


Рис.6. Спектральные зависимости оптических характеристик n (а), α (б), ϵ' (в), ϵ'' (г) цельной крови и плазмы крови мышей из контрольной группы и группы с карциномой Эрлиха в терагерцевом диапазоне частот. Символами обозначены границы среднеарифметического отклонения для частотных зависимостей соответствующих оптических характеристик исследованных образцов. Достоверность результатов для групп «плазма, карцинома» и «плазма, контроль» $p < 0.05$.

рам. При этом наблюдалось различие в характерных размерах компонентов плазмы: у животных контрольной группы большинство частиц имело диаметр от 7 до 40 нм, а у животных с карциномой Эрлиха – от 40 до 90 нм, что значительно превышает размер компонентов плазмы животных контрольной группы. Исходя из этих наблюдений можно предположить, что значительное различие в показателях поглощения плазмы крови в терагерцевом спектральном диапазоне у животных из контрольной и онкологической групп может быть связано с тем, что характерный размер частиц плазмы крови животных при развитии опухоли значительно увеличивается, вызывая уменьшение объемного содержания воды в плазме.

Из изложенного можно сделать вывод, что в исследованном терагерцевом диапазоне частот поглощение как воды, так и эритроцитов цельной крови лабораторных животных доминируют и не позволяют получить достоверной информации об изменениях в составе прочих компонентов крови. Плазма крови животных оказалась более показательным объектом для исследования с помощью терагерцевого излучения.

На рис.7 приведены оптические характеристики взвеси опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl, плазмы крови мыши с опухолью Эрлиха и чистого 0.9%-ного раствора NaCl в терагерцевом диапазоне частот. Видно, что в диапазоне 0.3–0.7 ТГц показатель преломления физиологического раствора превышает показатель преломления взвеси в нем онкологических клеток, а плазма кро-

ви животных с развивающейся опухолью Эрлиха имеет самый низкий показатель преломления. В диапазоне частот 0.5–0.7 ТГц показатель преломления данных образцов принимает значения 2.22, 2.15 и 2.09 соответственно. Аналогичная картина в данном диапазоне частот наблюдается у этих образцов и для показателей поглощения, причем различие существенно больше: при частоте 0.6 ТГц показатель поглощения 0.9%-ного раствора NaCl превышает показатель поглощения взвеси в нем онкологических клеток в среднем на 24%, а показатель поглощения плазмы крови животных с карциномой Эрлиха – на 44%. Из рис.7,в видно, что значения ϵ' для 0.9%-ного раствора NaCl и взвеси опухолевых клеток в физиологическом растворе не имеют существенных отличий. При этом в диапазоне 0.5–0.9 ТГц значения ϵ' для плазмы крови животных из онкологической группы в среднем на 25% выше, чем для взвеси опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl и для самого физиологического раствора. Зависимости мнимой части диэлектрической проницаемости ϵ'' для 0.9% раствора NaCl и взвеси опухолевых клеток в нем также имеют схожий вид. Значения ϵ'' для взвеси опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl и для 0.9%-ного раствора NaCl в среднем на 45% больше, чем для плазмы крови животных из онкологической группы. Из этих наблюдений можно сделать вывод, что наличие опухолевых клеток в растворе NaCl существенно увеличивает его пропускание для терагерцевого излучения благодаря замещению части воды в растворе клетками карциномы.

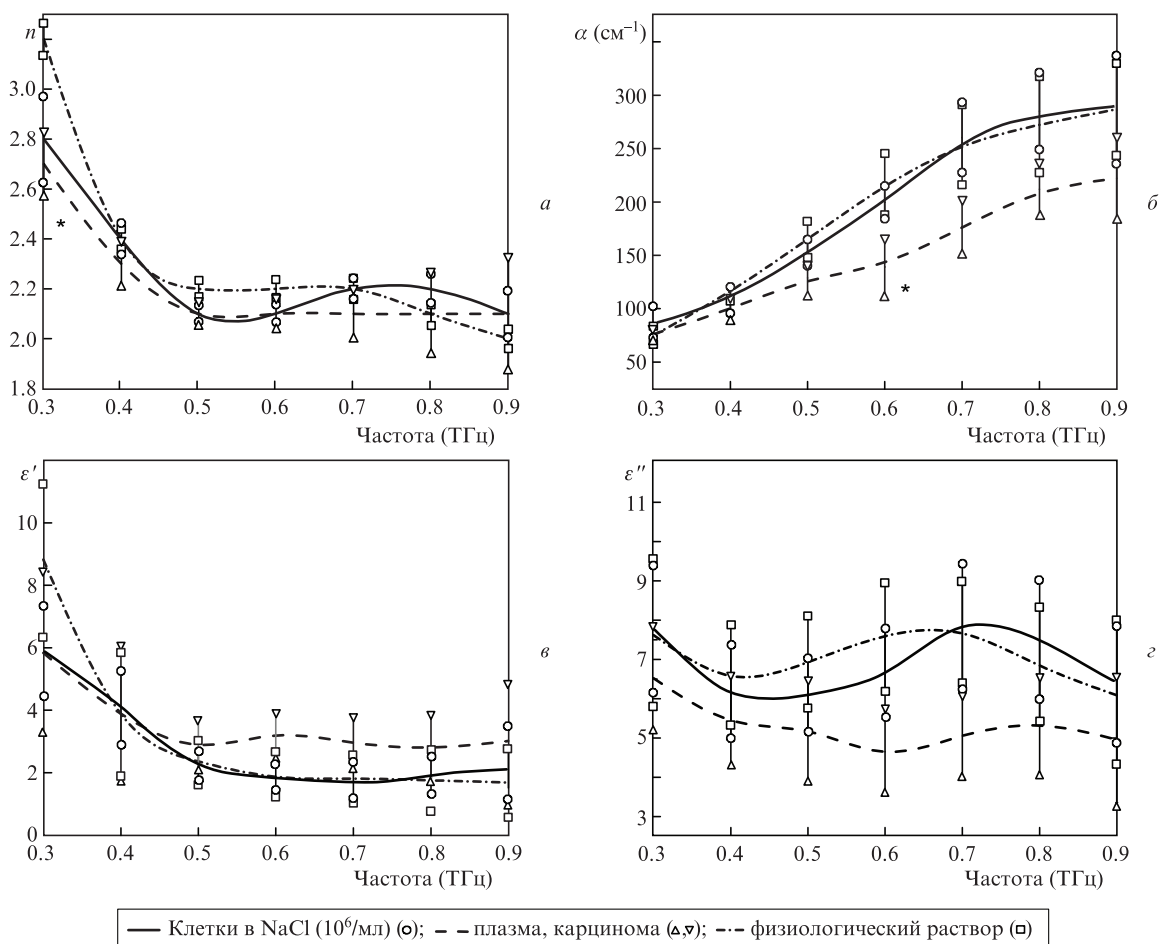


Рис.7. Оптические характеристики n (а), α (б), ϵ' (в), ϵ'' (г) исследуемых образцов: взвеси опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl, плазмы крови мыши с опухолью Эрлиха и чистого 0.9%-ного раствора NaCl в терагерцевом диапазоне частот. Символами обозначены границы среднеарифметического отклонения для частотных зависимостей соответствующих оптических характеристик исследованных образцов. Достоверность результатов для групп «плазма, карцинома» и «физиологический раствор» $p < 0.05$.

Также можно предположить, что наблюдаемые относительно малые значения коэффициента поглощения плазмы крови животного с карциномой Эрлиха по сравнению со значениями показателя поглощения для взвеси опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl обусловлены еще меньшим процентом содержания воды в данном образце.

Из зависимостей, приведенных на рис.8, видно, что изменение концентрации от 10 до 10⁶ опухолевых клеток на 1 мл физиологического раствор практически не меняет оптических свойств образца в исследуемом терагерцевом диапазоне частот.

Экспериментальные данные, полученные в настоящей работе, не дают нам ясной информации о том, чем вызвано различие в показателях поглощения и коэффициентах отражения плазмы крови животных контрольной и онкологической групп в терагерцевом диапазоне частот. С одной стороны, обнаруженный эффект можно было бы связать с тем, что плазма крови мышей с карциномой Эрлиха, содержащая в себе увеличенные в размерах компоненты (частицы), содержит при этом меньшее количество воды по сравнению с плазмой крови мышей контрольной группы. С другой стороны, можно допустить, что этот эффект может быть вызван изменениями в субклеточных структурах, возникающими у мышей с карциномой Эрлиха. Прояснить этот вопрос поможет постановка численного эксперимента по моделированию фантома

биологического образца сложной структуры и его оптических характеристик в исследуемом диапазоне частот.

6. Численное моделирование фантома биологического объекта и процедуры по определению его оптических характеристик с помощью ТГц-визуализации

Для создания пакета прикладных программ, численно моделирующего наши эксперименты по определению оптических характеристики биологических объектов с помощью терагерцевого импульсного излучения, мы использовали метод конечных разностей по времени (FDTD) [35]. Этот метод из класса сеточных методов решения дифференциальных уравнений является простым и эффективным средством трехмерного численного моделирования объектов произвольной формы с дисперсными и нелинейными свойствами и позволяет имитировать процесс распространения в них электромагнитного излучения на основе теоретической модели – дискретизации уравнений Максвелла, записанных в дифференциальной форме. В основе расчета методом конечных разностей лежит итерационный процесс, в котором значения компонент на каждом шаге рассчитываются из значений компонент на предыдущих шагах. Таким образом, для проведения расчетов необходимо разбить пространство задачи на эле-

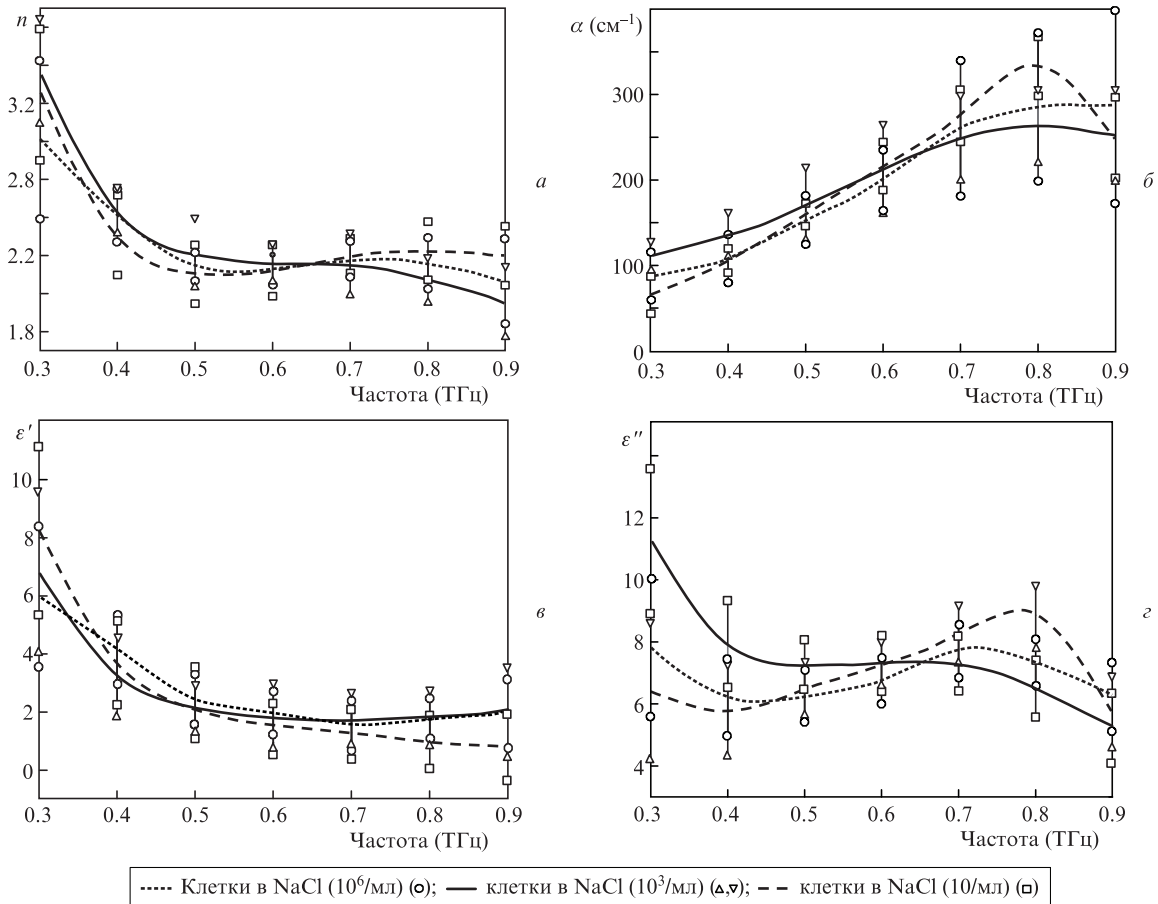


Рис.8. Оптические характеристики n (а), α (б), ϵ' (в), ϵ'' (г) взвесы опухолевых клеток в 0.9%-ном растворе NaCl при различной концентрации клеток. Символами обозначены границы среднеарифметического отклонения для частотных зависимостей соответствующих оптических характеристик исследуемых образцов.

ментарные ячейки и установить начальные значения для всех компонент электромагнитного поля. Для получения адекватных результатов работы данной теоретической модели необходимо, чтобы электромагнитное поле вблизи элемента разбиения изменялось незначительно, т.е. чтобы размеры элементарной ячейки разбиения составляли доли длины волны [35]. Использовались сетка с ячейками гексагональной формы и декартова система координат.

В условиях нашего эксперимента длина волны излучения варьировалась от 300 до 3000 мкм, поэтому минимальный размер сетки был выбран ~ 0.57 мкм, а максимальный – 7.49 мкм. В связи с тем, что в рамках поставленной задачи в перспективе мы планируем моделировать сложные объекты с существенно неоднородной структурой, разброс размеров ячейки сетки обусловлен необходимостью повышения точности вычислений в определенной области объема объекта.

Структура фантома (объект исследования) для численного эксперимента и геометрия эксперимента схематично приведены на рис.9. Моделируемый биологический объект задавался в форме прямоугольного параллелепипеда высотой около 100 мкм. Для описанного в настоящей работе калибровочного численного эксперимента в качестве фантомов биологических объектов мы использовали следующие модели: 1) упомянутый выше прямоугольный параллелепипед с оптическими характеристиками физиологического раствора; 2) тот же параллелепипед с оптическими характеристиками физиологического раствора, содержащий единичную цилиндрическую неоднородность с оптическими свойствами исследуемых образцов.

скую неоднородность с оптическими свойствами плазмы крови мыши с карциномой Эрлиха. Значения оптических характеристик преломления и поглощения для 0.9%-ного раствора NaCl и плазмы крови мыши с карциномой Эрлиха мы брали из результатов описанного в настоящей статье эксперимента. Сверху моделируемый биологический образец, как и в реальном эксперименте, закрыт кремниевой пластиной ($n_{Si} = 3.4$, толщина 1.04 мм).

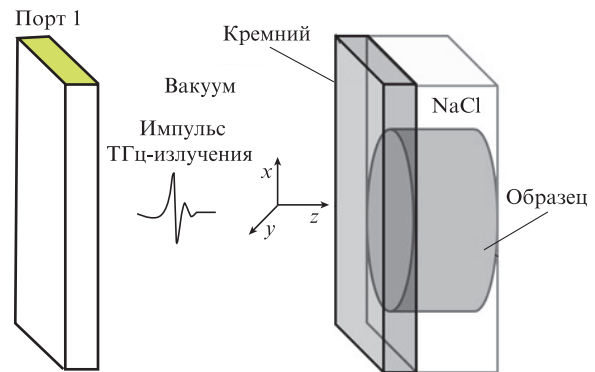


Рис.9. Геометрия численного эксперимента по моделированию характеристик отраженной электромагнитной волны. Структура фантома (объект исследования) представляет собой прямоугольный параллелепипед высотой 100 мкм с оптическими характеристиками физиологического раствора, содержащий единичную цилиндрическую неоднородность с оптическими свойствами исследуемых образцов.

Численный эксперимент моделирует решение задачи, когда на получившуюся структуру кремний – биологический образец, помещенную в бесконечное пространство, падает плоская электромагнитная волна с частотой 0.1–1.0 ТГц. Перед этой структурой помещается источник – приемник (порт 1 на рис.9). Между кремниевой пластиной и портом детектирования имеется вакуумный слой толщиной 1 мм. Моделирование характеристик отраженной электромагнитной волны осуществляется на границе кремний – биологический образец ($z = 0$).

На рис.10 приведены результаты численного моделирования комплексной амплитуды сигнала отраженной волны для частот 0.7 и 0.8 ТГц. Видно, что формы терагерцевого импульса, полученные в результате численного и реального экспериментов, хорошо согласуются между собой. Так, на 14-й пикосекунде наблюдается отражение от первой поверхности кремниевой пластины, на 42-й – от границы кремниевая пластина–образец «плазма, карцинома».

Рисунок 11 показывает, что коэффициенты отражения исследуемого образца (плазма крови мыши с карциномой Эрлиха), полученные в результате численного и реального экспериментов, хорошо согласуются между собой в диапазоне 0.5–0.8 ТГц.

Из рис.12 хорошо видно, что амплитуда волны, отраженной от поверхности физиологического раствора, очень мала (рис.12,*а*). В случае падения волны на поверхность объекта в области цилиндрической вставки с оптическими свойствами плазмы крови мыши с карциномой Эрлиха, отраженный сигнал существенно возрастает

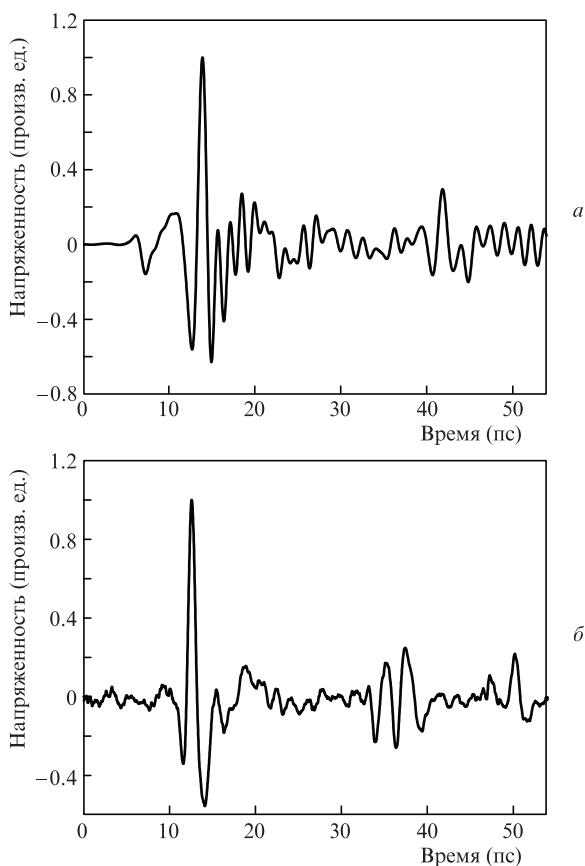


Рис.10. Поля терагерцевых импульсов, отраженных от первой поверхности кремниевой пластины и от границы кремниевая пластина–образец «плазма, карцинома»: *а* – результат моделирования, *б* – экспериментальный результат.

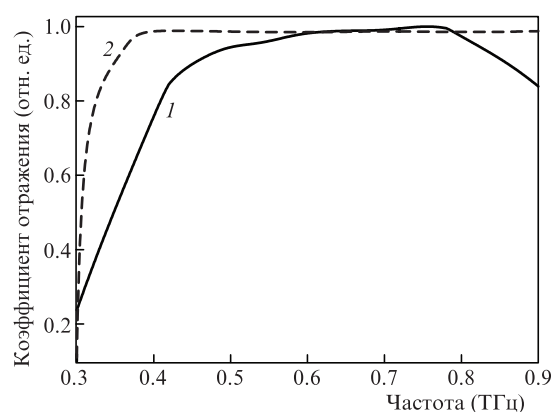


Рис.11. Коэффициенты отражения терагерцевого сигнала от образца с плазмой крови мыши с карциномой Эрлиха, полученные в результате численного (1) и реального (2) экспериментов.

(рис.12,*б, в*). При этом величина нормированного модуля амплитуды волны с частотой 0.8 ТГц заметно превышает аналогичную величину для волны с частотой 0.7 ТГц, что совпадает с полученными экспериментальными данными (см. рис.6 и 7).

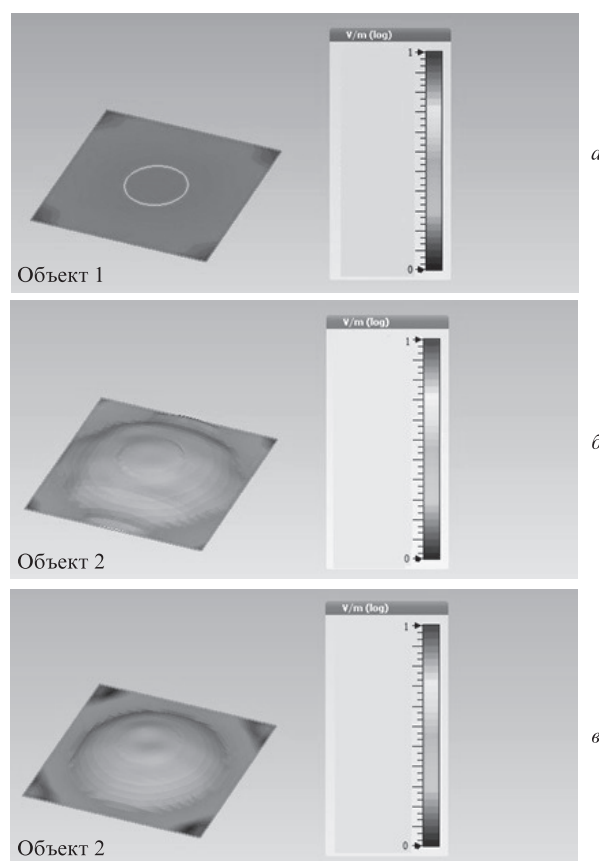


Рис.12. Результаты численного моделирования модуля амплитуды волны, отраженной от фантома биологического объекта: *а* – частота 0.7 ТГц, объект 1 с оптическими характеристиками 0.9%-ного раствора NaCl; *б* – частота 0.7 ТГц, объект 2 с оптическими характеристиками 0.9%-ного раствора NaCl и неоднородностью с оптическими свойствами плазмы крови мыши с карциномой Эрлиха; *в* – частота 0.8 ТГц, объект 2 с оптическими характеристиками 0.9%-ного раствора NaCl и неоднородностью с оптическими свойствами плазмы крови мыши с карциномой Эрлиха. Приведенные значения модуля амплитуды отраженной волны нормированы на модуль амплитуды падающей волны соответствующей частоты.

Таким образом, численно показана возможность использования импульсной терагерцевой визуализации в режиме на отражение для экспресс-диагностики онкологических заболеваний благодаря различию в амплитудах отраженных от образцов сигналов для животных контрольной и онкологической групп.

7. Заключение

Обобщая данные недавних публикаций в области терагерцевой спектроскопии цельной крови животных и человека, а также полученные нами данные, можно утверждать, что такие форменные элементы крови, как эритроциты и тромбоциты, вносят наибольший вклад в поглощение крови, в связи с чем изменения в составе других компонентов крови (лимфоциты и лейкоциты) методами терагерцевой спектроскопии в цельной крови достоверно не обнаружимы. Как показали наши эксперименты, плазма крови является наиболее перспективным объектом исследования, поскольку изменения ее состава, вызванные патологическими изменениями в организме, могут оказать значительное влияние на оптические свойства плазмы крови животных и человека в терагерцевом диапазоне частот.

В ходе описанного в настоящей работе *in vitro* эксперимента нами было выявлено уменьшение амплитуды коэффициента поглощения плазмы крови мышей с перевитой карциномой Эрлиха. Это указывает на возможность создания экспресс-диагностики онкологических заболеваний методом импульсной терагерцевой спектроскопии образцов плазмы крови. Экспериментальные данные, полученные в настоящей работе, не дают нам ясной информации о том, чем вызвано различие показателей поглощения и коэффициентов отражения плазмы крови животных контрольной и онкологической групп в терагерцевом диапазоне частот. С одной стороны, обнаруженный эффект можно было бы связать с тем, что плазма крови мышей с карциномой Эрлиха, содержащая в себе увеличенные в размерах компоненты (частицы), содержит при этом меньшее количество воды по сравнению с плазмой крови мышей контрольной группы. С другой стороны, можно допустить, что этот эффект может быть вызван изменениями в субклеточных структурах, возникающими у мышей с карциномой Эрлиха. Для прояснения этого вопроса планируются дальнейшие эксперименты *in vitro*.

Для помощи в интерпретации экспериментальных измерений нами разработан пакет прикладных программ, реализующий моделирование фантома биологического образца сложной структуры с последующими численным моделированием процесса распространения в нем терагерцевого излучения и определением его оптических характеристик. Проведенный эксперимент показал возможность визуализации модуля амплитуды волны, отраженной от образца плазмы крови животных с карциномой Эрлиха. Получено хорошее согласие с экспериментальными данными.

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01).

1. Мартынов С.А. *Гинекология*, **16** (4), 63 (2014).
2. Алексеева М.Л., Гусарова Е.В., Муллабаева С.М., Понкратов Т.С. *Проблемы репродукции*, **3**, 65 (2005).
3. *Terahertz Biomedical Science and Technology*. Joo-Hiuk Son (Ed.) (New York: CRC Press, 2014. p.377).
4. Rønne C., Thrane L., Åstrand P.-O., Wallqvist A., Mikkelsen K.V., Keiding S.R. *J. Chem. Phys.*, **107**, 5319 (1997).
5. Ladanyi B.M., Skaf M.S. *Annual Rev. Phys. Chem.*, **44** (1), 335 (1993).
6. Zaytsev K.I., Chernomyrdin N.V., Kudrin K.G., Gavidush A.A., Nosov P.A., Yurchenko S.O., Reshetov I.V. *J. Phys.*, **735**, 012076 (2016).
7. Mounaix P., Balacey H., Al-Ibadi A., Macgrogan G., Guillet J.P., Pickwell-MacPherson E. *Proc. 41st Intern. Conf. Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* (Copenhagen, Denmark, 2016, p. 1–2.22).
8. Doradla P. et al. *J. Biom. Opt.*, **18** (9), 090504 (2013).
9. Rong L. et al. *Sci. Rep.*, **5**, 8445 (2015).
10. Yookyeong Carolyn Sim, Kang-Min Ahn, Jae Yeon Park, Chan-Sik Park, Joo-Hiuk Son. *IEEE J. Biom. Heal. Inf.*, **17** (4), 779 (2013).
11. Yamaguchi S., Fukushi Y., Kubota O., Itsuji T., Ouchi T., Yamamoto S. *Sci. Rep.*, **6**, 30124 (2016).
12. Reid C., Reese G., Gibson A.P., Wallace V.P. *IEEE J. Biom. Heal. Inf.*, **17** (4), 774 (2013).
13. Jeong K., Huh Y.-M., Kim S.-H., et al. *J. Biom. Opt.*, **18** (10), 107008-1 (2013).
14. Ангелуц А.А., Балакин А.В., Евдокимов М.Г., Есаулков М.Н., Назаров М.М., Ожередов И.А., Сапожников Д.А., Солянкин П.М., Черкасова О.П., Шкуринов А.П. *Квантовая электроника*, **44** (7), 614 (2014) [*Quantum Electron.*, **44** (7), 614 (2014)].
15. Tzu-Fang Tseng, Borwen You, Hao-Cheng Gao, Tzung-Dau Wang, Chi-Kuang Sun. *Opt. Express*, **23** (7), 9440 (2015).
16. Черкасова О.П., Кузнецова Н.В., Пальчикова Н.А., Селятцкая В.Г. *Сахарный диабет*, **2**, 37 (2011).
17. Cherkasova O.P., Nazarov M.M., Smirnova I.N., Angeluts A.A., Shkurinov A.P. *Phys. Wave Phen.*, **22** (3), 185 (2014).
18. Черкасова О.П., Назаров М.М., Ангелуц А.А., Шкуринов А.П. *Оптика и спектроскопия*, **120** (1), 59 (2016).
19. Ezerskaya A.A., Serebryakova M.K., Nazarova I.V., Smolyanskaya O.A. *Phys. Wave Phen.*, **22** (3), 216 (2014).
20. Anisimov V.N. et al. *Cell Cycle*, **9** (1), 188 (2010).
21. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. *Клиническая трансфузиология* (М.: Гэотар-Медицина, 1997).
22. Hosnuter M., Aslan C., Isik D., Caliskan G., Arslan B., Durgun M. *J. Plast. Surg. Hand Surg.*, **51** (4), 235 (2016).
23. Cvjetkovic A., Lötvall J., Lässer C. *J. Extracell Vesicles*, **3**, 23111 (2014).
24. Ронин В.С. *Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований* (М.: Медицина, 1989, с. 161).
25. Xiao-Hui Zheng, Cui Cui, Xin-Xi Zhou, Yi-Xin Zeng, Wei-Hua Jia. *Chin. J. Cancer*, **32** (12), 667 (2013).
26. Gurtler A., Winnewisser C., Helm H., Jepsen P.U. *J. Opt. Soc. Am.*, **17**, 74 (2000).
27. Izumida S., Ono S., Liu Z., et al. *Appl. Phys. Lett.*, **75**, 451 (1999).
28. Mittleman D.M., Cunningham J., Nuss M.C., Geva M. *Appl. Phys. Lett.*, **71**, 16 (1997).
29. Lee Y.S. *Principles of Terahertz Science and Technology* (New York: Springer Science & Business Media, 2009. p. 40).
30. Chan W.L., Deibel J., Mittleman D.M. *Rep. Prog. Phys.*, **70**, 1325 (2007).
31. Balbekin N.S., Grachev Ya.V., Smirnov S.V., Bepalov V.G. *J. Phys.*, **584**, 012010 (2015).
32. Panchenko A., Tyndyk M., Smolyanskaya O., Sulatskiy M., Kravtseyuk O., Balbekin N., Khodzitsky M. *J. Phys.*, **735** (1), 012081 (2016).
33. Анцыгин В.Д., Мамрашев А.А., Николаев Н.А., Потатуркин О.И. *Автоматрия*, **46** (3), 110 (2010).
34. Chigrin R.N., Andreeva N.V. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **737** (1), 012055 (2016).
35. Самарский А.А., Николаев Е.С. *Методы решения сеточных уравнений* (М.: Наука, 1978).