

Оценка температурных изменений в лунке культурального планшета с поглощающими стенками при облучении в оптическом диапазоне на 3D модели опухолевых сфероидов

Н.В.Сапогова, Д.В.Южакова, А.А.Смирнов, М.В.Ширманова, М.М.Лукина,
А.И.Гаврина, А.В.Изосимова, Е.В.Загайнова, В.А.Каменский

Изучены температурные условия для фотодинамической терапии культуры опухолевых клеток, организованных в 3D сфероиды. Сфероиды находятся в питательной жидкости в лунке специального культурального планшета с поглощающими стенками. Представлена математическая модель, описывающая распределение температуры в лунке с питательной жидкостью при нагреве оптическим излучением. Показано, что температура в объеме лунки распределена неоднородно, причем температура на поверхности лунки может существенно отличаться от температуры в ее объеме.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, 3D опухолевые сфероиды, теплопроводность, воздействие лазерного излучения на опухоль.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой клинически одобренный, малоинвазивный терапевтический метод разрушения клеток-мишеней под действием облучения. Этот метод основан на накоплении в очаге заболевания фототоксичных препаратов – фотосенсибилизаторов, которые при возбуждении светом с определенной длиной волны генерируют активные формы кислорода, токсичные для живых клеток [1, 2]. В настоящее время ФДТ широко используется для лечения злокачественных новообразований, в частности различных видов рака кожи и полых внутренних органов, а также некоторых неонкологических заболеваний [3]. Несмотря на значительный прогресс в области лечения рака с помощью ФДТ, все еще остается огромное поле для исследований, ведется активная разработка новых фотосенсибилизаторов и режимов облучения опухолей.

Стандартным этапом при разработке новых подходов к ФДТ опухолей является *in vitro* исследование на монослойной культуре опухолевых клеток либо на 3D опухолевых сфероидах [4–7]. Согласно общепринятой методике, облучение опухолевых клеток проводится в куль-

туральных планшетах с поглощающими стенками из черного непрозрачного пластика для минимизации перераспределения света [8, 9]. Однако в ходе облучения может происходить значительное повышение температуры среды в лунках с опухолевыми клетками и, как следствие, развитие гипертермических реакций в облученных клетках, что может привести к неверной интерпретации результатов терапии. В большинстве работ контроль изменения температуры в процессе облучения осуществляется на поверхности среды в лунке. Очевидно, что температуры в объеме лунки и на ее поверхности могут существенно различаться, что необходимо учитывать при постановке эксперимента. Хотя расчеты распределения температуры в биосредах велись и раньше [10], данная конфигурация биологического эксперимента стала актуальной недавно.

Целью представленной работы было получение математической модели, позволяющей рассчитать температурные изменения во всем объеме лунки культурального планшета с черными непрозрачными стенками в ходе облучения излучением оптического диапазона.

В качестве объекта исследования выступали 3D опухолевые сфероиды, сформированные из клеток линии рака шейки матки человека HeLa Kyoto. Опухолевые сфероиды представляют собой микроразмерные агрегаты из опухолевых клеток сферической формы. Эти сфероиды являются чрезвычайно удобной моделью для исследований, т. к., с одной стороны, они ближе по своим свойствам к реальным опухолям, чем монослойная клеточная культура, а с другой стороны, просты в использовании. Сфероиды культивировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ПанЭко, Россия), содержащей феноловый красный для наблюдения за ее pH и, соответственно, за состоянием сфероидов. Облучение и визуализацию сфероидов проводили в бесцветной среде DMEM без фенолового красного (Gibco, США), фоновая флуоресценция которой минимальна. Для облучения опухолевых сфероидов использовали светодиод Epistar LED

Н.В.Сапогова, А.А.Смирнов, В.А.Каменский. Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Ульянова, 46;

e-mail: ns@ufr.appl.sci-nnov.ru; vlad@ufr.appl.sci-nnov.ru

Д.В.Южакова, М.В.Ширманова, М.М.Лукина, А.И.Гаврина. Приволжский исследовательский медицинский университет, Россия, 603005 Н.Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1; e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru

А.В.Изосимова. Приволжский исследовательский медицинский университет, Россия, 603005 Н.Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1; Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Россия, 603950 Н.Новгород, просп. Гагарина, 23

Е.В.Загайнова. Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Россия, 603950 Н.Новгород, просп. Гагарина, 23

Поступила в редакцию 20 марта 2020 г., после доработки – 16 июня 2020 г.

(Тайвань) с центральной длиной волны $\lambda = 465$ нм. Сфероиды находились на дне или в середине кюветы по высоте. Температуру на поверхности лунки в процессе эксперимента измеряли с помощью тепловизора Optris PI400 (Optris GmbH, Германия).

В рамках настоящей работы выявим, насколько температура на поверхности, определяемая экспериментально, соответствует температуре в объеме жидкости. Для этого необходимо решить задачу теплопроводности в рассматриваемой системе. При расчетах будем полагать, что жидкая среда до краев наполняет цилиндрическую лунку планшета глубиной $H = 1$ см с внутренним диаметром $D = 6.5$ мм. Толщина стенок лунки 0.7 мм. Рассмотрим нагрев среды при воздействии излучения на длине волны 465 или 630 нм. Облучение на длине волны 630 нм является стандартным для ФДТ опухолей [11], расчет на длине волны 465 нм необходим для работы с фототоксичным белком miniSOG [6]. Излучение проходит через апертуру, совпадающую с внутренним диаметром лунки и расположенную непосредственно у ее верхней границы, имеет большой угол расходимости $\beta \sim 120^\circ$, что характерно для суперлюминесцентных диодов, и максимально поглощается стенками лунки.

Измерения показали, что коэффициент поглощения μ_{las} бесцветной питательной среды DMEM без фенолового красного составляет 0.1 см^{-1} на длине волны 465 нм. Коэффициент поглощения стандартной питательной среды DMEM с феноловым красным меняется из-за добавления кислотно-основного индикатора и составляет 0.67 см^{-1} на длине волны 465 нм. На длине волны 630 нм обе среды DMEM, бесцветная и с феноловым красным, практически прозрачны, и их коэффициенты поглощения равны 0.016 и 0.026 см^{-1} соответственно.

При расчетах будем полагать, что опухолевые сфероиды не отличаются по своим оптическим свойствам от жидкой среды, т.е. коэффициент поглощения сфероидов совпадает с коэффициентом поглощения среды и рассеяние излучения на них отсутствует.

Стенки планшета на рассматриваемых длинах волн являются непрозрачными. Для расчетов коэффициент поглощения материала стенок принимался таким, чтобы 99% излучения поглощалось стенкой лунки. Дно планшета выполнено из прозрачного пластика, поглощением которого пренебрегали.

При расчетах учитывалось охлаждение стенок лунки и свободной поверхности жидкой среды в результате теплообмена с воздухом комнатной температуры.

Распределение температуры в среде описывается уравнением теплопроводности

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \Delta T + \frac{f}{c\rho}, \quad (1)$$

где T – температура среды; α – коэффициент теплопроводности среды; c и ρ – удельная теплоемкость и плотность среды соответственно; f – интенсивность источника тепла. Поскольку рассматриваемая система обладает цилиндрической симметрией, расчет производится в координатах (r, z) , где r – расстояние от оси, z – расстояние от поверхности лунки.

Определим f в уравнении (1):

$$f = f_0 \left[1 + \frac{z \tan(\beta/2)}{R} \right]^{-2} \exp\left(-\int_0^{l(r,z)} \mu dl\right), \quad (2)$$

Здесь f_0 определяет интенсивность излучения на поверхности жидкости в лунке при $z = 0$; $R = 3.25$ мм – внутренний радиус лунки. В эксперименте источником излучения служила центральная часть пучка, а его края обрезались апертурой, совпадающей с внутренним диаметром лунки. Экспериментально измеренный профиль центральной части пучка показал, что $f_0(r) \approx \text{const}$. Коэффициент $\{1 + z/[R \tan(\beta/2)]\}^{-2}$ позволяет оценить снижение интенсивности при распространении пучка вследствие его расходимости как отношение исходной площади пучка на входе к площади, которую занимал бы пучок при распространении в жидкости в отсутствие стенок лунки на глубине z . Экспоненциальный множитель в уравнении (2) отвечает за ослабление излучения из-за поглощения при прохождении пути $l(r, z)$; здесь коэффициент поглощения $\mu = \mu(r, z)$ есть функция координат, поскольку в жидкости и в материале стенок лунки коэффициенты поглощения различны.

На внешних границах лунки и на свободной границе жидкости учет теплообмена с воздухом дает следующие граничные условия:

$$k \frac{\partial T}{\partial n} + U(T - T_{\text{room}}) = 0, \quad (3)$$

где $k = \alpha c \rho$ – коэффициент теплопроводности; U – коэффициент теплообмена соответствующей среды; T_{room} – комнатная температура; $\partial/\partial n$ – производная, взятая вдоль нормали к поверхности. Будем полагать, что на внутренних границах выполняется условие идеального теплового контакта, т.е. температура и поток тепла непрерывны.

В условиях геометрии задачи усредненный коэффициент отражения излучения от стенок лунки в верхней ее части (область от поверхности до половины высоты лунки) мал – не превышает 2.5%, что позволяет пренебречь рассмотрением этого эффекта. Ближе ко дну лунки коэффициент отражения увеличивается. Малость доли излучения, попадающей на внутреннюю поверхность нижней половины лунки (не более 10%), позволяет не рассматривать эффект отражения излучения от стенок во всем объеме лунки.

При расчетах будем принимать во внимание, что в биологических средах существует критическая максимальная температура $T_{\text{crit}} = 43^\circ\text{C}$ [12], превышение которой приводит к развитию гипертермических реакций в облученных клетках; рассмотрение этих реакций выходит за рамки ФДТ. При $T_{\text{room}} = 20^\circ\text{C}$ это дает максимальный нагрев 23°C .

Поскольку питательная среда и сфероид состоят преимущественно из воды, их физические характеристики мы полагали равными соответствующим характеристикам воды. А именно, мы считали, что плотность, теплоемкость и коэффициент теплопроводности жидкости и сфероиды таковы: $\rho = 1 \text{ г/см}^3$, $c = 4.2 \text{ Дж} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ и $k = 6 \times 10^{-3} \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ [13]. Для материала стенок лунки (полистирол) использованы следующие параметры: $c_w = 1.11 \text{ Дж} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$, $\rho_w = 1.1 \text{ г/см}^3$, $\alpha_w = 10^{-3} \text{ см}^2/\text{с}$ [14]. Коэффициент теплообмена полистирола с воздухом $U_w = 8 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{К}^{-1}$, что соответствует газу со свободной конвекцией [15].

Коэффициент теплообмена жидкости с воздухом U_{las} существенно зависит от условий эксперимента. Для определения величины U_{las} было проведено измерение температуры поверхности жидкости в ходе облучения при двух разных мощностях оптического излучения. Это

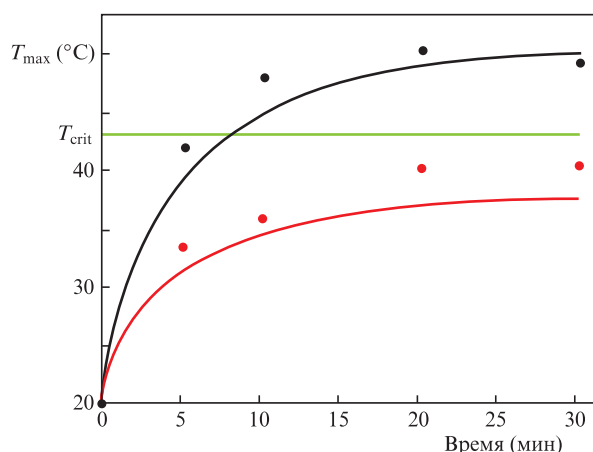


Рис.1. Экспериментальные (точки) и рассчитанные (кривые) зависимости от времени максимальной температуры T_{\max} нагрева поверхности жидкости при облучении светодиоидом с центральной длиной волны 465 нм при оптической мощности 129 мВт (черные кривая и точки) и 75 мВт (красные кривая и точки). Цветные варианты рис.1–4 помещены на сайте нашего журнала <https://www.quantum-electron.ru>.

позволило оценить величину U_{las} , которая составила $\sim 45 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{К}^{-1}$. Экспериментальные данные и результаты расчета приведены на рис.1.

Численные расчеты проводились на прямоугольной сетке методом переменных направлений.

С помощью полученной оценки коэффициента теплообмена U_{las} было рассчитано распределение температуры в рассматриваемом образце после 30 мин облучения при мощности 75 мВт на длинах волн 465 и 630 нм. Результаты представлены на рис.2 для бесцветной и с феноловым красным сред DMEM на длинах волн 465 и 630 нм. Поскольку эти среды на длине волны 630 нм практически прозрачны, картина распределения температур для них одинакова. На рисунках кружком обозначен сфероид диаметром 500 мкм для понимания масштаба сфероида по отношению к размеру кюветы. Положение сфероида выбрано условно – в центре лунки на высоте 2 мм от дна.

На рис.3 представлено изменение в ходе облучения максимальной температуры на поверхности жидкости

(жирные линии) и в области условного расположения 3D сфероида (тонкие линии), обозначенного на рис.2 черным кружком.

Из рис.2 видно, что в процессе облучения среды в ней создается неоднородное по глубине распределение температуры. Максимальный нагрев происходит вблизи поверхности за счет поглощения излучения стенками лунки. В глубине лунки, ближе ко дну, температура жидкости снижается. Картина распределения температуры в среде практически одинакова во всех рассмотренных случаях. Однако при облучении среды DMEM с феноловым красным на длине волны 465 нм наблюдается более сильный нагрев – максимальная температура превышает комнатную на $\sim 8\%$. Это объясняется существенным поглощением жидкостью с феноловым красным на длине волны 465 нм.

Различие между максимальным превышением температуры над комнатной на поверхности жидкости и в области условной локализации 3D сфероида (область расположения сфероида обозначена на рис.2 черным кружком) составляет $\sim 16\%$. При проведении экспериментов с нагреванием среды излучением необходимо принимать во внимание то, что температура поверхности среды, измеряемая с помощью тепловизора, может существенно отличаться от температуры в глубине среды, в области нахождения опухолевых сфероидов. Это особенно важно для задач, в которых сфероиды нужно нагреть до определенной температуры, но при этом не превысить T_{crit} .

Проведенные теоретические расчеты были апробированы на 3D опухолевых сфероидов. Для этого образцы, содержащие сфероиды в питательной среде, облучали в течение 20 мин излучением с плотностью мощности 75 мВт/см² на длине волны 465 или 630 нм. Согласно проведенным ранее расчетам (рис.3), нагрев среды, достигаемый в лунке культурального планшета при таких режимах облучения, не превышает критических значений и не должен приводить к гипертермическим реакциям.

В нормальном состоянии сфероид состоит из центрального ядра и периферического слоя (рис.4, а, в). Плотная темная центральная зона – это в основном мертвые некротические клетки, погибшие вследствие гипоксии и недостаточного поступления питательных веществ в цен-

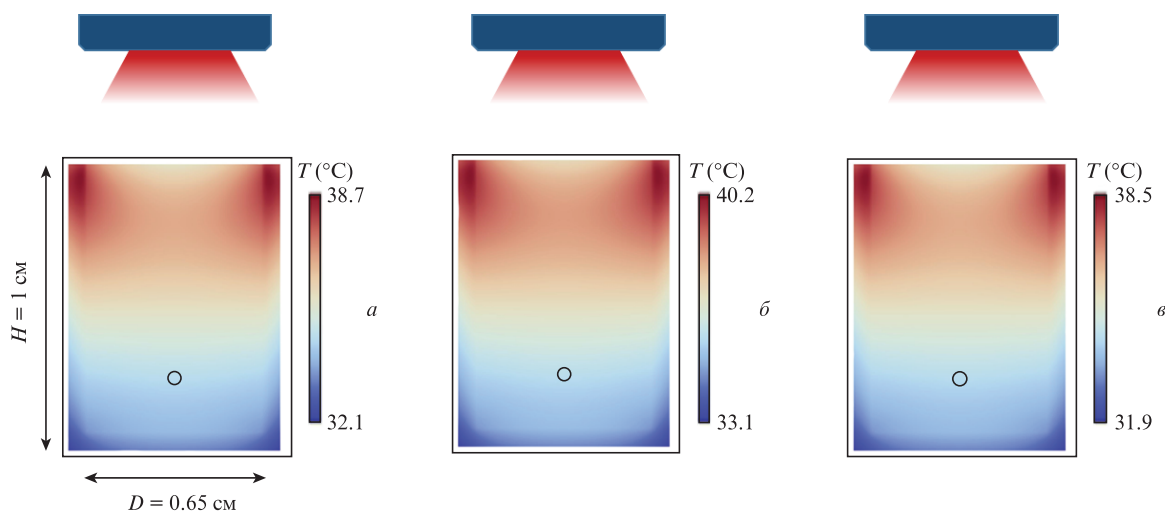


Рис.2. Распределение температуры в образце после 30 мин облучения при мощности 75 мВт: бесцветная среда DMEM, $\lambda = 465 \text{ нм}$ (а), среда DMEM с феноловым красным, 465 нм (б), с феноловым красным и бесцветная среды DMEM, 630 нм (в). Окружностью обозначена область условной локализации сфероида.

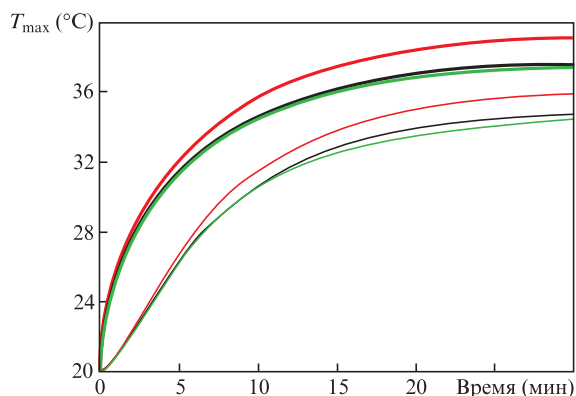


Рис.3. Зависимости от времени максимальной температуры, достигаемой на поверхности среды (толстые линии) и в условной области расположения сфероида (тонкие линии) при облучении кюветы излучением мощностью 75 мВт: бесцветная среда DMEM, $\lambda = 465$ нм (черные кривые), среда DMEM с феноловым красным, 465 нм (красные кривые), бесцветная и с феноловым красным среды DMEM, 630 нм (зеленые кривые).

тральную зону, а более светлый периферический слой – это большей частью живые, активно делящиеся клетки. В норме опухолевые сфероиды могут незначительно отличаться друг от друга вследствие естественного биологического разнообразия.

На рис.4,*a, в* представлены светлопольные и флуоресцентные изображения опухолевых сфероидов без воздей-

ствия лазерного излучения, а на рис.4,*б, г* – облученных в течение 20 мин лазерным излучением с плотностью мощности 75 мВт/см² на длине волны 465 либо 630 нм соответственно. Как видно на светлопольных изображениях, сфероиды после облучения, так же как и контрольные (необлученные) сфероиды, состоят из темного центрального ядра и более светлой периферической зоны.

Для верификации жизнеспособности опухолевых клеток в составе сфероида, последние были окрашены с помощью набора флуоресцентных красителей Apoptosis/Necrosis detection kit (компания Abcam, Великобритания). Краситель CytoCalcein Violet 450 связывается с цитоплазмой живых клеток – синий канал на флуоресцентных изображениях. Краситель 7-aminoactinomycin D связывается с ядром поврежденных мертвых клеток и служит маркером некроза – зеленый канал на флуоресцентных изображениях. Флуоресцентные изображения на рис.4. представляют собой наложение двух каналов. Видно, что темное некротическое ядро соответствует зеленой зоне погибших клеток, в которой присутствует некоторое количество живых клеток, тогда как более светлый периферический слой соответствует синей зоне живых клеток, в которой встречаются единичные мертвые клетки.

Сравнительный анализ контрольных необлученных и облученных сфероидов показал, что облучение при плотности мощности 75 мВт/см² в течение 20 мин на длине волны 465 либо 630 нм не оказывает на сфероиды негативного воздействия. Их формы, а также соотношение

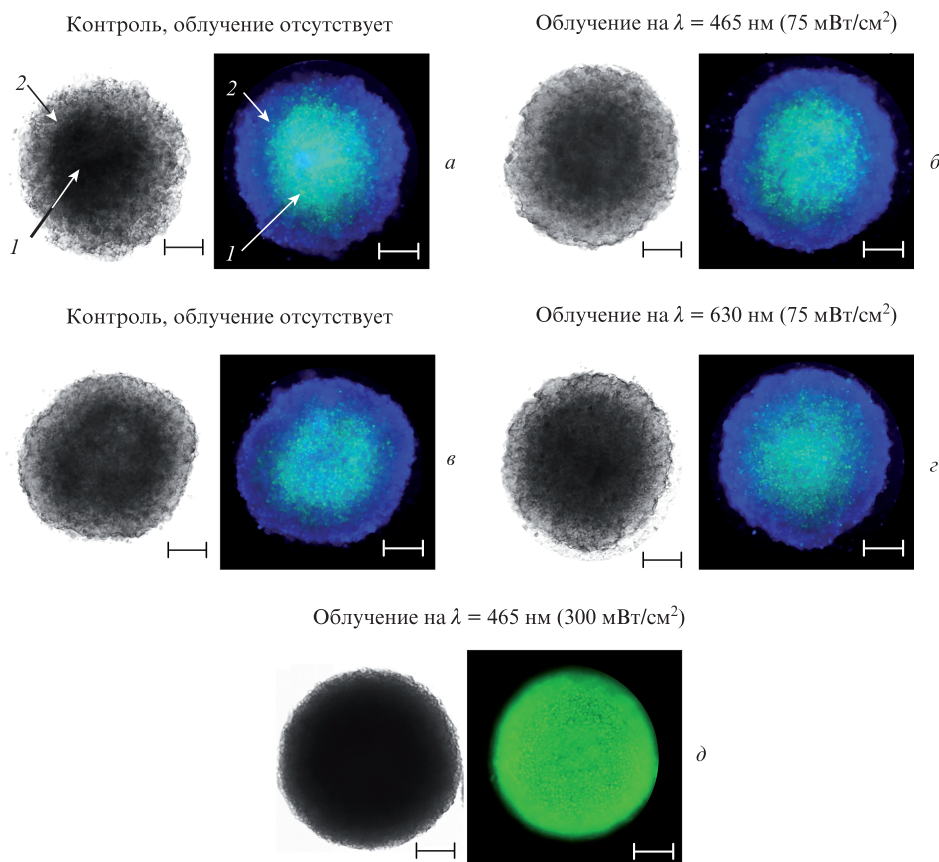


Рис.4. Микроскопические изображения опухолевых сфероидов HeLa Kyoto. Для каждого сфероида представлены два изображения: слева – полученное с помощью светлопольной микроскопии, справа – с помощью флуоресцентной микроскопии. Синий канал – жизнеспособные клетки, зеленый канал – погибшие некротические клетки. Стрелками отмечены зоны сфероида: 1 – темное некротическое ядро, 2 – светлый периферический слой живых клеток; *a, в* – контрольные, необлученные, сфероиды, *б, г* – сфероиды после облучения с плотностью мощности 75 мВт/см² в течение 20 мин на длине волны 465 либо 630 нм соответственно, *д* – сфероид после облучения с плотностью мощности 300 мВт/см². Масштаб 170 мкм. Для получения флуоресцентных изображений окрашивание проводилось после облучения.

зон живых и мертвых клеток в облученных сфероидах, в целом не отличаются от контрольных. Незначительные отличия объясняются тем, что в норме, без воздействий, сфероиды также несущественно отличаются друг от друга. Таким образом, экспериментально подтверждается отсутствие тепловых эффектов при облучении 3D сфероидов излучением с плотностью мощности 75 мВт/см².

Для сравнения на рис.4,д представлен сфероид, облученный при плотности мощности 300 мВт/см² на длине волны 465 нм. В этом случае, согласно расчетам, среда нагревается на величину, существенно большую T_{crit} , что должно приводить к гипертермической реакции. Из рис.4,д видно, что структуры облученного и необлученного сфероидов существенно различны. Практически весь объем облученного сфероида представляет собой плотную темную массу погибших клеток (светлопольное изображение), связанных с красителем 7-aminoactinomycin D и визуализированных в зеленом канале (флуоресцентное изображение). На светлопольном изображении отсутствует светлый периферический слой живых клеток и, соответственно, синяя зона на флуоресцентном изображении. Таким образом, в данном случае наглядно демонстрируется гипертермическая реакция.

Проведенные экспериментальные исследования показывают, что рассмотренная в работе теоретическая модель позволяет адекватно определить температуру в образце при облучении ее излучением оптического диапазона и оценить возможность наступления гипертермических реакций в опухолевых сфероидах. Согласно рассмотренной модели температура в объеме лунки распределена неоднородно, и ее значение на поверхности может существенно отличаться от значения в объеме лунки.

Работа профинансирована Министерством науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ИПФ РАН (проект №0035-2019-0012) и РФФИ (грант №18-42-520027 p_a).

1. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. *CA Cancer J. Clin.*, **61**, 4 (2011).
2. Allison R.R., Moghissi K. *Clin. Endosc.*, **46**, 1 (2013).
3. Van Straten D., Mashayekhi V., de Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. *Cancers (Basel)*, **9**, 2 (2017).
4. Austin E., Jagdeo J. *J. Vis. Exp.*, **138**, 58190 (2018).
5. Gao R., Mei X., Yan D., Liang R., Wei M. *Nat. Commun.*, **9**, 2798 (2018).
6. Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 11 (2013).
7. Kuznetsova D.S., Shirmanova M.V., Dudenkova V.V., Subochev P.V., Turchin I.V., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Shakhov B.E., Kamensky V.A. *J. Biophoton.*, **8**, 11 (2015).
8. Gavrina A.I., Shirmanova M.V., Aksenova N.A., Yuzhakova D.V., Snopova L.B., Solovieva A.B., Timashev P.S., Dudenkova V.V., Zagaynova E.V. *J. Photochem. Photobiol. B*, **178**, 614 (2018).
9. Yuzhakova D.V., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Muravieva M.S., Gavrina A.I., Shirmanova M.V., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Zagaynova E.V. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1861**, 12 (2017).
10. Sturesson C., Andersson-Engels S. *Phys. Med. Biol.*, **40**, 2037 (1995).
11. Странадко Е.Ф. *Лазерная медицина*, **6**, 1 (2002).
12. Dewey W.C. *Int. J. Hyperthermia*, **10**, 4 (1994).
13. *Физические величины. Справочник*. Под ред. И.С.Григорьева, Е.З.Мейлихова (М.: Энергоатомиздат, 1991, с.1232).
14. Новиченок Л.Н., Шульман З.П. *Теплофизические свойства полимеров* (Минск: Работа и техника, 1971, с.120).
15. www.thermopedia.com/content/84.