

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

На правах рукописи



Швачкина Марина Евгеньевна

Исследование влияния оптического иммерсионного просветления на фотосшивание коллагена тканей

03.01.02 — Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
доцент кафедры оптики и биофотоники
Правдин А.Б.

Саратов — 2020

Оглавление

Введение	5
1 Обзор литературы	13
1.1 Структура коллагенсодержащих тканей	13
1.1.1 Структура и свойства склеры	13
1.1.2 Структура и свойства сухожилия	18
1.2 Поперечные сшивки между молекулами коллагена. Методы кросслинкинга коллагена	21
1.2.1 Применение рибофлавин/УФ кросслинкинга для укрепления роговицы при кератэктазиях	23
1.2.2 Химические механизмы образования поперечных связей при рибофлавин/УФ кросслинкинге	25
1.2.3 Концентрация рибофлавина в ткани при фотосшивании	28
1.2.4 Локализация сшивок	29
1.2.5 Применение рибофлавин/УФ кросслинкинга для модификации свойств склеры	31
1.3 Оптическое просветление склеры	34
2 Влияние оптического просветления на эффективность метода упрочнения склеры, основанного на рибофлавин/УФ фотосшивании коллагена	39
2.1 Оптическое иммерсионное просветление склеры в ультрафиолетовой области	40
2.2 Влияние оптического просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания склеры	43
2.2.1 Влияние иммерсионного агента на механические свойства склеры	43
2.2.2 Изменение механических свойств склеры после рибофлавин/УФ фотосшивания с предварительным оптическим просветлением ткани	45
2.3 Заключение к главе 2	48

3	Оценка влияния оптического просветления на протекание рибофлавин/УФ кросслинкинга в склере с помощью двухфотонной микроскопии	51
3.1	Материалы и методы	52
3.2	Интенсивность SHG изображений склеры после рибофлавин/УФ кросслинкинга	54
3.3	Анализ влияния оптического просветления на протекание рибофлавин/УФ кросслинкинга в склере на основе данных FLIM	57
3.3.1	Результаты исследования флуоресценции эндогенных флуорофоров в склере и флуоресценции рибофлавина. Декомпозиция функций затухания флуоресценции	59
3.3.2	Результаты измерений для разных стадий процедуры фотосшивания	66
3.4	Заключение к главе 3	72
4	Исследование характеристик коллагеновых волокон в условиях частичной дегидратации и иммерсионного просветления	74
4.1	Методика ОКТ-мониторинга характеристик коллагеновых пучков при их дегидратации, регидратации и иммерсионном просветлении	76
4.1.1	Экспериментальная оценка среднего группового показателя преломления ткани	78
4.1.2	Способ оценки среднего группового показателя двулучепреломления ткани	82
4.1.3	Экспериментальная оценка коэффициента изменения объема ткани	84
4.1.4	Образцы. Свойства образцов в исходном состоянии	85
4.1.5	Стандартный коэффициент изменения объема	88
4.1.6	Способ оценки содержания воды в образце при его небольшом отклонении от референтного уровня	89
4.2	Исследование зависимости средних групповых показателей преломления и двулучепреломления коллагеновых пучков от содержания воды в ткани. Калибровочный график для определения содержания воды в коллагенсодержащих тканях по значению их среднего группового показателя преломления	90
4.3	Результаты, полученные при иммерсионном просветлении образцов	97
4.3.1	Иммерсионные агенты	97
4.3.2	Данные по изменению объема и среднего группового показателя преломления ткани при иммерсионном просветлении	98

4.3.3	Данные по изменению средних показателей двулучепреломления ткани при иммерсионном просветлении	104
4.3.4	Количественная оценка содержания воды и иммерсионного агента в ткани в процессе иммерсионного просветления	105
4.3.5	Оценка иммерсионных агентов в контексте их применения при поляризационном картировании тканей	113
4.4	Теоретическая модель двулучепреломления коллагеновых волокон	113
4.5	Заключение к главе 4	121
5	Изучение возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани	123
5.1	Материалы и методы	124
5.2	Результаты и обсуждение	126
5.3	Заключение к главе 5	131
	Заключение	133
	Приложения	135
A	Дополнительные рисунки и таблицы	135
B	Характеризация коллагенсодержащих тканей методами поляризационной микроскопии	141
B.1	Двулучепреломление коллагенсодержащих тканей	142
B.2	Картируемые оптические характеристики	143
B.3	Экспериментальная методика и оборудование	147
B.4	Оценка возможности определения параметров коллагеновой структуры в толстых образцах с помощью поляризационного картографирования	149
B.5	Картографирование образцов склеры	157
B.6	Картографирование образцов вторичных сухожильных пучков	165
	Список литературы	171

Введение

Актуальность темы

Одним из основных заболеваний, приводящих к нарушению зрения, является близорукость, серьезной формой которой является прогрессирующая миопия, характеризующаяся растяжением склеры. Перспективным методом лечения прогрессирующей миопии, не предполагающим внедрение инородных тел в организм, является коррекция механических свойств склеры задней поверхности глазного яблока посредством фотовоздействия, приводящего к образованию дополнительных ковалентных связей между молекулами коллагена внутри склеры (фотосшивание/кросслинкинг коллагена), с использованием рибофлавина в качестве сенсibilизатора и ультрафиолетового излучения. Фотосшивание склерального коллагена повышает жесткость склеры и улучшает ее механические свойства, способствуя стабилизации патологического процесса (замедляя или даже останавливая патологические изменения) при прогрессирующей миопии, что доказано в экспериментах на мелких лабораторных животных [1–3]. В то же время в литературе [4] отмечается недостаточная эффективность существующих методик кросслинкинга коллагена для склеры человека, что в большой степени связано с сильным рассеянием ультрафиолетового излучения биотканью, ослабляющим эффективность фотовоздействия в толще ткани. Увеличить глубину проникновения ультрафиолетового излучения в биоткань позволяет метод иммерсионного оптического просветления [5–8]. Нанесение иммерсионных агентов на склеру перед процедурой фотосшивания может увеличить эффективность данного метода и уменьшить требуемую дозу ультрафиолетового облучения, делая процедуру более безопасной. Эксперименты показывают [9], что сенсibilизированное фотовоздействие в условиях оптического иммерсионного просветления приводит к большему увеличению жесткости образцов склеры *ex vivo*, однако, механизм явления не был исследован. В литературе, в частности в [8], было отмечено уменьшение площади образца соединительной ткани при действии иммерсионных просветляющих агентов. В работе [10] на образцах дермы показано, что химическое сшивание ткани в дегидратированном

состоянии способствует сохранению контрактированного состояния ткани после ее регидратации. В свете этого можно ожидать, что воздействие гиперосмотического просветляющего агента на заднюю поверхность склеры приведет к сокращению площади ткани, то есть к купированию ее растяжения, обусловленного миопией, а фиксация такого сжатого состояния путем образования сшивок позволит не только замедлить развитие миопии, но и уменьшить уже развившееся к моменту воздействия растяжение (изменение формы) задней стенки, и тем самым осуществить не только стабилизирующий, но и терапевтический эффект.

Цели и задачи диссертационной работы

Основной целью данной работы является изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на результаты процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания коллагеносодержащих тканей.

Судя по литературе, исследований оптического просветления склеры в ближней ультрафиолетовой (УФ-А) спектральной области практически не проводилось. В контексте настоящей работы эффективность иммерсионного оптического просветления ткани в этой спектральной области, в диапазоне длин волн 360–370 нм, представляет особый интерес, поскольку в рассматриваемом методе кросслинкинга сшивание ткани осуществляется под действием излучения этого диапазона. В связи с этим актуальной задачей является исследование эффективности иммерсионного просветления склеры в этом спектральном диапазоне при использовании различных иммерсионных агентов.

Физические, и в том числе механические, свойства коллагеносодержащих тканей сильно зависят от степени гидратации ткани [11], которая может существенно изменяться при проведении фотосшивания. Это делает актуальной разработку простой эффективной методики, позволяющей оценивать содержание воды в ткани на разных этапах процедуры рибофлавин/УФ кросслинкинга. Кроме того, существует потребность в простых и надежных методах, позволяющих оценивать изменение состава жидкостей в ткани в процессе ее иммерсионного просветления и при вымывании иммерсионного агента из ткани.

Анализ морфологических изменений в ткани, сопровождающих и определяющих изменение механических и геометрических свойств ткани, подвергнутой рибофлавин/УФ фотосшиванию в условиях иммерсионного просветления, и выбор условий эксперимента по измерению механических характеристик требуют достаточно полной информации о морфологии образцов. Известно, что механические свойства таких тканей, как склера и дерма, являются анизотропными – они зависят от направления приложения силы. Это связано с наличием направ-

лений преимущественной ориентации коллагеновых волокон на участках макроскопических размеров. Известно, что склере характерна значительная вариация направления преимущественной ориентации коллагеновых волокон и степени их ориентационной упорядоченности. Литературные данные о макроструктурной организации коллагеновой сети в склере очень ограничены. Для характеристики организации тканей, таких как склера, на макроуровне используются карты ориентации коллагеновых волокон, показывающие преимущественное направление и степень их ориентации в разных областях. В известных методах картографирования коллагенового матрикса биотканей используются метод малоуглового рассеяния света [12, 13], метод рассеяния рентгеновских лучей [14–16], нелинейная микроскопия [12, 17] и поляризационная микроскопия [18, 19]. Методы поляризационной микроскопии являются наиболее простыми и доступными. Кроме того, они обеспечивают наибольшую площадь захвата данных. При проведении механических измерений требуется информация об ориентации коллагеновых волокон для образца ткани (полоски склеральной оболочки) как целого, при его толщине от 400 до 2000 мкм. При такой толщине образец является непрозрачным из-за сильного рассеяния, вследствие чего не подходит для поляризационного картографирования. Для проведения поляризационного картографирования, прозрачность ткани должна быть увеличена, что может быть достигнуто с помощью техники иммерсионного просветления. В связи с этим актуальной является задача подбора условий эксперимента, в том числе, условий иммерсионного просветления, при которых поляризационное картографирование могло бы быть использовано для количественной характеристики морфологии коллагенового матрикса склеры.

Таким образом, достижение основной цели работы потребовало решения следующих основных задач:

1. Исследование влияния иммерсионных агентов на коллимированное пропускание склеры в диапазоне длин волн 360–370 нм.
2. Проведение оценочных биомеханических измерений, направленных на изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания.
3. Оценка возможности использования поляризационно-микроскопического картографирования для картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах тканей, таких как склера, при использовании техники иммерсионного просветления.

4. Исследование возможностей применения для контроля изменений биохимического состава, происходящих в ткани при фотосшивании, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции.
5. Разработка надежной методики оценки содержания воды в ткани для характеристики образцов коллагенсодержащей ткани на разных этапах процесса рибофлавин/УФ фотосшивания.
6. Разработка надежной методики, позволяющей оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации.
7. Исследование влияния степени гидратации ткани во время фотовоздействия на свойства фотосшитой ткани после ее регидратации.

Научная новизна

В данной работе впервые экспериментально выявлена тенденция к большему увеличению жесткости образца склеры при рибофлавин/УФ фотосшивании в условиях предварительного иммерсионного просветления ткани. Впервые для контроля ориентации коллагеновых волокон в исследуемых толстых образцах склеры применена методика поляризационного картографирования в сочетании с иммерсионным просветлением. Впервые показано, что применение иммерсионного просветления позволяет увеличить интенсивность протекания фотохимических реакций, сопровождающих фотосшивание. Разработана и впервые использована методика оценки относительной концентрации рибофлавина в строме склеры, основанная на декомпозиции функций затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям. Разработана оригинальная ОКТ-методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани. Также оригинальными являются методики ОКТ-контроля содержания воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации и оценки изменения содержания воды в фибриллах и межфибриллярной фазе при дегидратации и регидратации ткани. Впервые показано, что рибофлавин/УФ фотосшивание ткани в дегидратированном состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным, и оценено пороговое значение степени гидратации, при котором наблюдается фиксирование контрактированного состояния ткани.

Научно-практическая значимость работы

Совокупность полученных результатов работы показывает, что рибофлавин/УФ фотосшивание коллагенсодержащих биологических тканей, подвергнутых перед облучением действию иммерсионных агентов, может приводить к большему увеличению жесткости и контракции ткани, что позволяет рассматривать иммерсионное просветление как возможный этап предварительной обработки ткани в процедуре рибофлавин/УФ фотоукрепления склеры, способствующий улучшению эффективности этой процедуры. Найденные условия проведения измерений, позволяющие использовать результаты поляризационного картографирования для картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах ткани, могут быть использованы при разработке практических методик картирования макроструктуры коллагенового матрикса склеры, дермы, сухожилия, хряща, стенок кровеносных сосудов. Методика оценки локальной относительной концентрации рибофлавина, основанная на декомпозиции функций затухания флуоресценции, может быть положена в основу контроля диффузии рибофлавина в склеру при его поверхностном нанесении *in vivo*. Разработанные ОКТ-методики контроля содержания воды и иммерсионного агента в образцах ткани могут быть эффективно использованы при исследовании динамики воздействия различных иммерсионных агентов на коллагенсодержащие ткани.

Положения и результаты, выносимые на защиту

Положения

1. В условиях, когда рибофлавин/УФ фотосшивание осуществляется при уровнях объемной гидратации коллагеновых пучков меньше 0,8, может происходить фиксирование контрактированного состояния ткани за счет образования межфибриллярных сшивок.
2. Зависимость среднего показателя преломления коллагеновых пучков на длине волны 930 нм от объемного содержания воды в ткани может считаться линейной по меньшей мере в диапазоне значений объемного содержания воды от 0,8 до 0,2.

Результаты

1. Разработанная методика определения содержания воды в ткани по величине среднего группового показателя преломления ткани.

2. Разработанная методика ОКТ-мониторинга изменения содержания воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в постановке задач исследования. Автором самостоятельно проведены экспериментальные работы и обработка полученных данных, вывод аналитических выражений, компьютерные расчеты и анализ полученных результатов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов, полученных в работе, обуславливается использованием апробированных методик измерений, адекватностью используемых теоретических моделей, воспроизводимостью результатов экспериментов, а также согласием полученных результатов с данными, полученными другими исследователями. Основные научные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике "Saratov Fall Meeting" (Саратов, 2015-2020); XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 2015); Всероссийская молодежная научная школа-конференция "Практическая биофизика – 2015" (Саратов, 2015); VI Всероссийская неделя науки с международным участием, "Week of Russian science" (WeRuS-2017) (Саратов, 2017); XX международная конференция молодых ученых и специалистов "Оптика-2017" (Санкт-Петербург, 2017); XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, 2018).

Публикации. По материалам исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, опубликовано 13 статей, из них 7 статей в изданиях, входящих в список ВАК и зарубежных журналах, индексируемых библиографическими базами "Web of Science" и "Scopus".

Статьи в рецензируемых журналах из списка рекомендованных ВАК:

1. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры методом фотосшивания коллагена // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика.* – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 37–41.
2. Швачкина М. Е., Правдин А. Б., Тихонов Д. А., Каменских Т. Г., Яковлев Д. Д., Яковлев Д. А. Оценка возможностей трансмиссионного поляризационного картогра-

фирования для характеристики макроструктуры склеры // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2017. – Т.13, № 2. – С. 435–441.

3. Швачкина М. Е., Яковлев Д. Д., Лазарева Е. Н., Правдин А. Б., Яковлев Д. А. Мониторинг процесса иммерсионного оптического просветления коллагеновых волокон с помощью оптической когерентной томографии // *Оптика и спектроскопия*. – 2019. – Т. 127, № 2. – С. 337–346.
4. Швачкина М. Е. О возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*. – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 210–222.

Статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

5. Yakovlev D. D., Shvachkina M. E., Sherman M. M., Spivak A. V., Pravdin A. B., Yakovlev D. A. Quantitative mapping of collagen fiber alignment in thick tissue samples using transmission polarized-light microscopy // *Journal of Biomedical Optics*. – 2016. – Vol. 21, no.7. – Pp. 071111-1–071111-12
6. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing / A. N. Bashkatov, K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy et al. // *Journal of Biomedical Optics*. – 2018. – Vol.23, no. 9. – P.091416
7. Shvachkina M. E., Knyazkova A. I., Sandykova E. A. Influence of optical clearing on collagen crosslinking of sclera // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2019. – Vol. 1145, no. 1. – P. 012056.

Остальные публикации:

8. Швачкина М.Е., Правдин А.Б. О спектре поглощения рибофлавина, введенного в ткань склеры // *Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2015: материалы Международного симпозиума и Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2015*. – 2015. – С. 212–215.
9. Швачкина М. Е., Яковлев Д. Д., Правдин А. Б., Яковлев Д. А. Характеризация коллагено-содержащих тканей методами поляризационной микроскопии // *XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов*. – 2015. – С.134–143.

10. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. Влияние оптического просветления на оптические и механические свойства склеры // *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*. – 2015. – Т. 5. – № 11.
11. Швачкина М. Е., Яковлев Д. Д., Правдин А.Б., Яковлев Д. А. Оценка характеристик двулучепреломления коллагеносодержащих тканей с помощью поляризационного картографирования и ОКТ // *Сборник трудов X Международной конференции молодых ученых и специалистов «Оптика – 2017»*. – 2017. – С. 583–585.
12. Швачкина М. Е., Яковлев Д. Д., Правдин А. Б., Яковлев Д. А. Мониторинг изменения размеров и средних показателей преломления и двулучепреломления коллагеновых пучков при иммерсионном оптическом просветлении с помощью томографа ThorLabs-OSCP930SR // *Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2017: материалы Международного симпозиума и Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2017*. – 2017. – С. 28–35.
13. Shvachkina M. E., Yakovlev D. D., Pravdin A. B., Yakovlev D. A. Average refractive index of tendon as a function of water content // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2018. – Vol.4, no.1. – P. 010302.

Гранты научных фондов. Исследования, вошедшие в данную диссертационную работу, были поддержаны следующими научными фондами: РФФИ, проект № 17-00-00275 (17-00-00272), 2018-2020гг.; РФФИ, проект №17-32-50190, 2018г.; Министерство образования и науки РФ, проект № 3.1586.2017/4.6, 2019 г.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, приложения и списка цитируемой литературы, состоящего из 250 наименований. Объем диссертации без приложения составляет 158 страниц, включая 76 рисунков и 2 таблицы.

Глава 1

Обзор литературы

1.1 Строение коллагенсодержащих тканей

1.1.1 Строение и свойства склеры

Склера представляет собой плотную малососудистую соединительную ткань, которая в основном состоит из коллагеновых волокон, упакованных в пучки в виде ламелей и формирующих характерную слоистую структуру [20]. Коллагеновый матрикс создается и регенерируется фибробластами, клеточными элементами склеры [20]. Склера защищает внутриглазные структуры от механических воздействий, противостоит изменению внутриглазного давления, поддерживает форму глаза и обеспечивает крепление его наружных мышц. В различных участках глазного яблока склера имеет различную толщину. Толщина склеры является наибольшей у заднего полюса глазного яблока, около зрительного нерва, и постепенно уменьшается по мере приближения к экватору. В местах крепления наружных прямых мышц толщина склеры является наименьшей [21].

Коллаген составляет примерно 80% сухого веса склеры и является структурообразующим веществом, обеспечивающим основные функции склеры [20, 22]. Молекула коллагена состоит из трех α -цепей, скрученных в одну регулярную спираль, стабилизированную в основном посредством водородных связей между различными аминокислотными остатками [23]. Такое образование известно под названием тропоколлаген. Молекула тропоколлагена представляет собой жесткий стержень длиной 300 нм и диаметром 1,5 нм, который состоит из триплетов аминокислот G-X-Y, где G – глицин, X, Y – остаток любой аминокислоты, кроме глицина (чаще всего пролин и гидроксипролин) [24, 25]. Молекулы тропоколлагена образуют фибриллы цилиндрической формы с характерным периодом структуры 64–67 нм [20, 26, 27]. Различают несколько типов коллагена, отличающихся аминокислотным составом α -цепей [23]. В

основном склера состоит из коллагена типа I, но в ней также содержится коллаген типа III, V, VI [25]. Структура и функции каждого типа коллагена значительно различаются. Было показано, что коллаген типа V взаимодействует с коллагеном типа I для регуляции диаметра коллагеновых фибрилл во время фибрилlogenеза [28].

Основным неводным элементом интерстициальной жидкости – жидкости, заполняющей межфибрилярное пространство, – являются протеогликаны. Молекулы протеогликанов состоят из сердцевинного белка, к которому ковалентно присоединены боковые цепи гликозаминогликана (ГАГ). Основными протеогликанами склеры человека являются декорин и бигликан [25]. Гликозаминогликаны – полимеры, состоящие из повторяющихся дисахаридных звеньев, которые включают аминсахара (N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин) и остатки уроновых кислот (D-глюкуроновой и L-идуроновой) [20]. Содержание протеогликанов в склере составляет примерно 3% от сухого веса [22], что в 3 раза меньше, чем в роговице. Малое содержание протеогликанов, которые регулируют диффузионный транспорт воды за счет гидрофильной природы гликозаминогликанов, является одной из причин того, что содержание воды в склере меньше, чем в роговице (78%), и составляет около 68% [22, 24, 29].

Волокна эластина, состоящие из микрофибрилярных и аморфных компонентов, дополняют коллагеновый каркас склеры. Эластин состоит из неполярных гидрофобных аминокислот, таких как аланин, валин, изолейцин и лейцин [25]. Он также содержит две уникальные аминокислоты, десмозин и изодесмосин, которые участвуют в образовании связей между полипептидными цепями [25]. Биохимический анализ показал, что эластиновый компонент склеры взрослого человека составляет около 2% от сухого веса [22, 25]. Волокна и микрофибриллы эластина могут находиться между или внутри коллагеновых пучков. Наибольшее количество волокон эластина обнаруживается в области лимба, а также в наружных и внутренних слоях склеры [25]. С возрастом количество волокон эластина существенно уменьшается [22].

В склере выделяют три основных слоя: эписклеру, то есть наружный слой, строму и внутренний слой – так называемую темную пластинку. Эписклера является тонким, содержащим сосуды слоем ткани, расположенным между стромой склеры и теноновой капсулой. В гистологическом смысле она представляет собой рыхлую неоформленную соединительную ткань. Эта ткань уплотняется вблизи теноновой капсулы и у сухожилий наружных мышц глаза. Пучки коллагеновых волокон в эписклере более тонкие, чем в строме склеры [21]. В этом слое склеры присутствуют немиелинизированные и миелинизированные свободные нервные окончания [23]. Структурными компонентами эписклеры, помимо коллагеновых волокон, являются также фиброциты, стромальные меланоциты, тучные клетки и лимфоци-

ты [21]. Строма составляет 90% от толщины склеры и в значительной степени определяет ее биомеханические свойства [21]. В строме склеры коллагеновые пучки имеют лентообразную форму и толщину 0,5–6,0 мкм и идут преимущественно параллельно поверхности склеры [21]. Местами коллагеновые пучки отделяются друг от друга сравнительно большими, случайно расположенными полостями [24]. Темная пластинка склеры образована тонкими пучками коллагеновых волокон, идущими к сосудистой оболочке. Этот слой содержит большое количество меланина, который локализуется, в основном, в пространстве между пучками коллагеновых волокон [21]. Этот слой служит переходной зоной от склеры к сосудистой оболочке [23].

Фибриллы в коллагеновых волокнах склеры имеют широкий разброс диаметров, от 25 до 230 нм (рисунок 1.1). Средний диаметр коллагеновых фибрилл в склере человека составляет 100 ± 30 нм [22]. В пучке коллагеновые фибриллы лежат параллельно друг другу, однако не так регулярно, как в роговице [24]. Диаметры коллагеновых фибрилл и пучков изменяются по глубине склеры. В поверхностном слое склеры коллагеновые фибриллы толще, а пучки уже по ширине (1–5 мкм) и тоньше по толщине (0,5–2 мкм), чем в более глубоких слоях [30]. Пучки образуют сетчатую структуру, завитки, петли или дуги в зависимости от положения в склере. Во внутренних слоях склеры коллагеновые фибриллы тоньше, а размер пучков варьируется в широком диапазоне по ширине (1–50 мкм) и толщине (0,5–6 мкм) [30] (рисунок 1.2). Ориентация коллагеновых пучков в склере зависит от их местоположения, внутриглазного давления и напряжения глазных мышц [24].

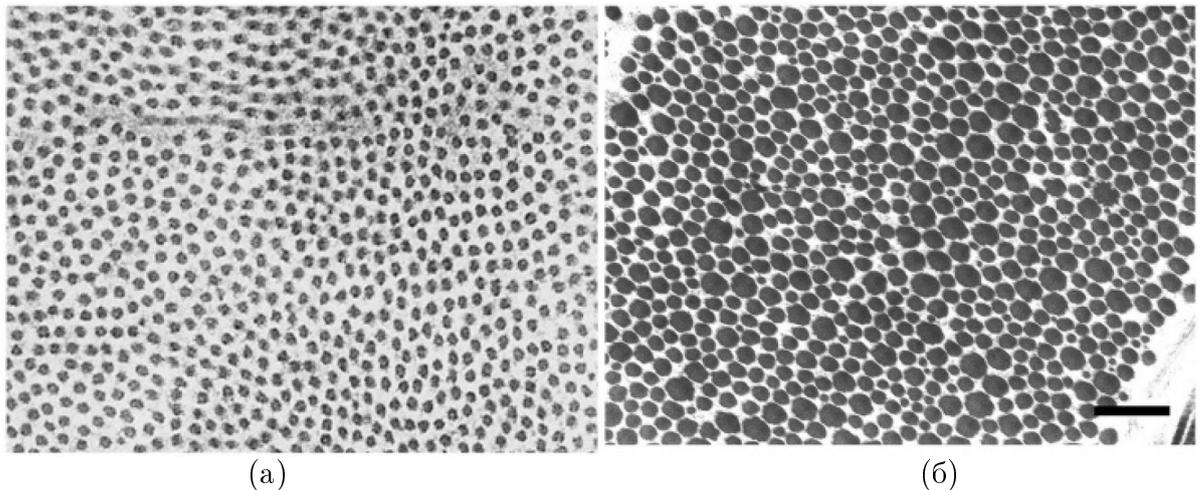


Рисунок 1.1. Фибриллы в коллагеновых пучках роговицы (а) и склеры (б). Показаны поперечные сечения пучков. Масштабная планка 50 нм [24].

Основным клеточным элементом склеры является фибробласт [21]. Эти клетки располагаются между пучками коллагеновых волокон. Они обладают палочковидным ядром и

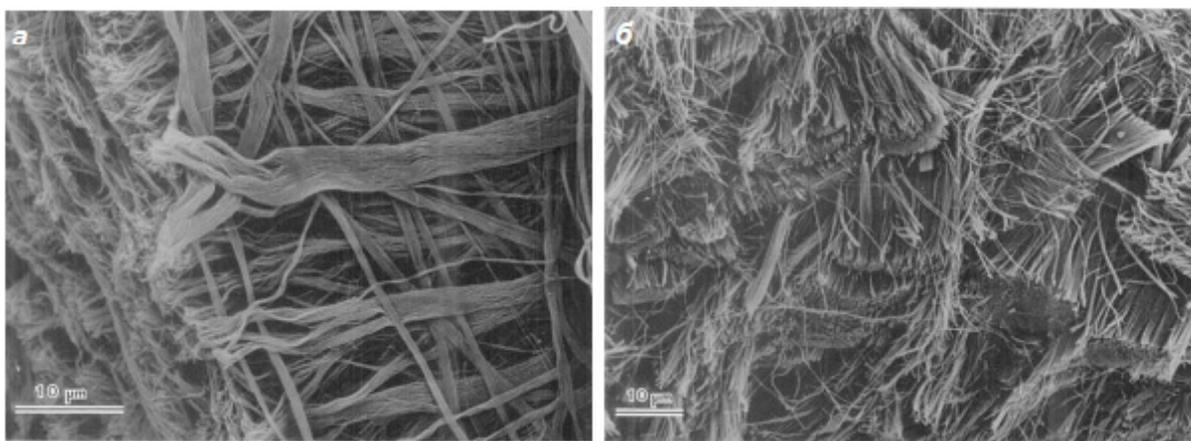


Рисунок 1.2. Изображения поверхностного (а) и внутреннего (б) слоя склеры, полученные с помощью растрового электронного микроскопа (SEM) ($\times 2900$) [30].

длинными цитоплазматическими отростками, которые контактируют с отростками соседних клеток. В зрелости лишь в посттравматическом периоде эти клетки активируются и синтезируют структурные компоненты межклеточного вещества. Помимо фибробластов, в склере встречаются меланоциты и лимфоциты [21].

Механические свойства склеры зависят от ее толщины, организации коллагеновых волокон, а также от степени гидратации ткани [11, 24]. Склера представляет собой вязкоупругую структуру [31]. При малых растяжениях склеры в течение короткого времени наблюдается упругая обратимая деформация. При дальнейшем растяжении наблюдается вязкоупругое, пластическое течение, которое характеризуется медленным растяжением склеры или ползучестью под постоянной нагрузкой [32] (рисунок 1.3).

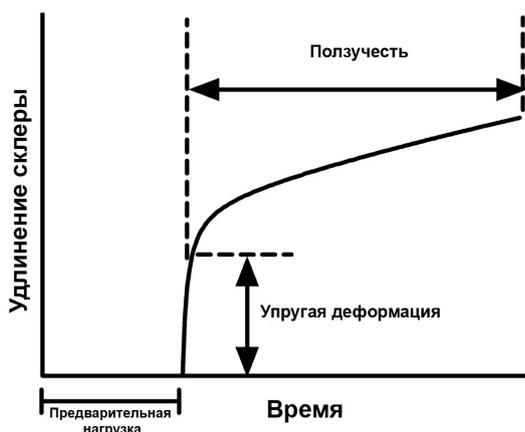


Рисунок 1.3. Удлинение склеры под действием постоянной нагрузки [32].

Диапазон изменений модуля Юнга для склеры является широким [33]. По данным измерения скорости распространения ультразвука в склере человека [33] модуль Юнга в ради-

альном направлении (в направлении своей толщины) в среднем составляет 0,5 МПа, тогда как в продольном и поперечном направлениях этот показатель меняется в пределах 3–40 МПа в зависимости от локализации исследуемого образца склеры. Несколько другие значения модуля упругости в продольном и поперечном направлениях указаны в работах [34] (1,8–2,9 МПа) и [35] (5,3–41,0 МПа). Также в работе [33] было показано, что продольный модуль Юнга существенно зависит от локализации исследуемой области склеры и уменьшается в направлении от передней области к заднему полюсу глаза. В работе [33] также приведены значения предельной продольной (меридиональной) деформации склеры человека и показано, что наибольшей растяжимостью склера обладает в области заднего полюса глаза ($103,0 \pm 6,3\%$) [33].

Особенности строения склеры при миопии

При развитии миопии происходит изменение морфологической структуры, биохимических показателей и механических свойств склеры [36]. В работе [37] представлены данные по изменению толщины склеры и диаметра коллагеновых пучков при развитии миопии. Эксперименты проводились на землеройках, у которых искусственным образом инициировалась миопия как следствие монокулярной депривации (закрытия одного глаза). Было замечено уменьшение толщины склеры в задней области глаза при миопии примерно на 20% по сравнению со склерой нормального (здорового) глаза. Также в работе [37] было установлено, что сухой вес склеры глаза с миопией на 6,8% меньше по сравнению с нормальным глазом. В работе [37] было показано, что в склере при развитии миопии происходит уменьшение диаметра коллагеновых волокон, и наблюдается преобладание фибрилл с малым диаметром (< 60 нм). Ультрамикроскопические изменения, наблюдаемые в миопической склере, свидетельствуют о нарушении роста и организации коллагеновых фибрилл, что может происходить из-за нарушения функции фибробластов и аномального образования фибрилл, а также из-за усиленного катаболизма коллагена в склере [38].

Биомеханические измерения [37] показали, что жесткость склеры млекопитающих на ранних стадиях развития близорукости уменьшается (рисунок 1.4) и что по большей части различие в жесткости между миопическими и нормальными глазами обусловлено изменением толщины склеры. Также было показано, что склера млекопитающих при развитии миопии становится более растяжимой и характеризуется повышенной ползучестью.

В работе [39] было показано, что скорость ползучести (продолжающегося удлинения при постоянном напряжении) склеры значительно больше в образцах с миопией по сравнению с

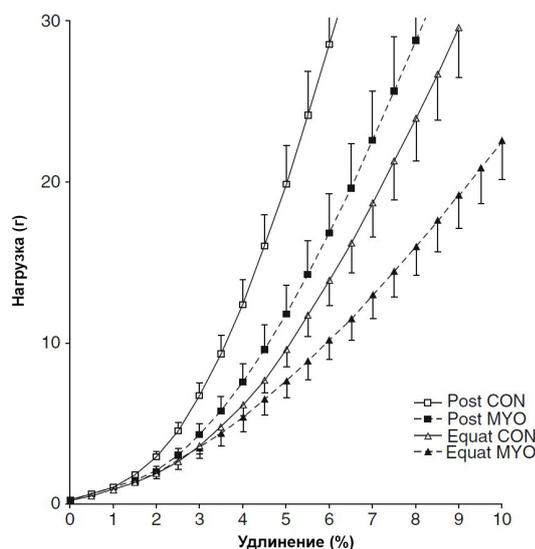


Рисунок 1.4. Эластичность склеры в задней (Post) и экваториальной (Equat) областях глазного яблока для нормальных (CON) и миопических (MYO) глаз землероек [32].

контрольными образцами. Изменение ползучести склеры является более важным фактором при объяснении удлинения глазного яблока при миопии, чем изменение эластичности.

В работе [40] отмечено, что в склере при миопии снижается уровень сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов. Также, было замечено [41], что скорость синтеза протеогликанов в задней области глаза отрицательно коррелирует со скоростью удлинения глазного яблока. В исследованиях на мышах с дефицитом таких протеогликанов, как люмикан и бромодулин [42], были обнаружены аномалии диаметра и ориентации коллагеновых волокон, истончение склеры и увеличение осевой длины глаза. На основе этого было выдвинуто предположение, что эти компоненты внеклеточного матрикса важны для поддержания биомеханических свойств склеры. Еще одним фактором, влияющим на биомеханические характеристики склеры при миопии, может быть дефицит внутри- и межмолекулярных связей (сшивок) между коллагеновыми фибриллами и протеогликанами [31].

1.1.2 Строение и свойства сухожилия

Ряд экспериментов по фотосшиванию в данной работе выполнено на вторичных коллагеновых пучках сухожилий, которые являются более простыми по структуре и более удобными в экспериментальном плане, чем склера. По своей структуре сухожилие является одной из наиболее простых коллагенсодержащих тканей. Сухожилиям характерны высокая плотность упаковки и высокий ориентационный порядок коллагеновых волокон [24, 43–50]. Благодаря простоте структуры сухожилия являются хорошей моделью для исследования свойств

коллагеновых волокон. Сухожилие состоит из плотно лежащих параллельных пучков коллагеновых фибрилл. Основной структурной единицей сухожилия на макроуровне является вторичный сухожильный пучок (рисунок 1.5). Соседние вторичные сухожильные пучки механически впрямую не связаны между собой и легко отделяются друг от друга при препарировании. Диаметр вторичных пучков сухожилия хвоста крысы обычно лежит в пределах от 50 до 450 мкм [46–49]. Деление вторичных сухожильных пучков на первичные пучки является условным. В качестве границ первичных пучков рассматриваются слои клеток. Слои клеток расположены островками и не образуют регулярной сплошной структуры. Поэтому четко обрисовать границы первичного пучка, как правило, не представляется возможным. Также невозможно физически разделить вторичный пучок на первичные пучки [47].

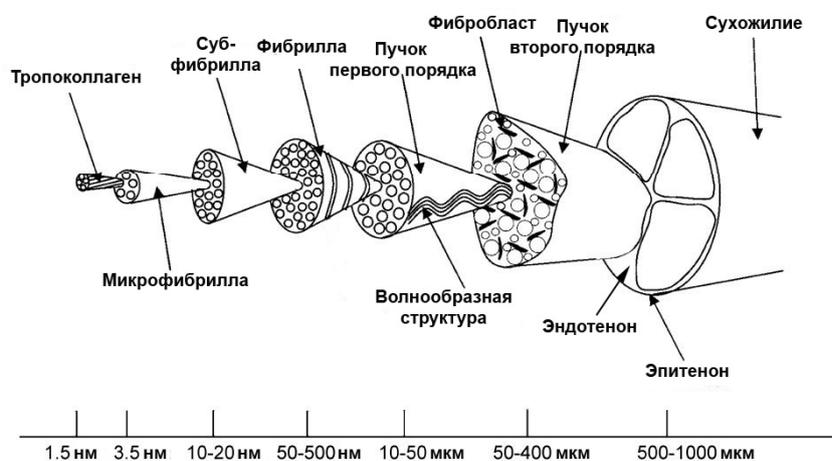


Рисунок 1.5. Иерархическая структура сухожилия [49].

Вторичные сухожильные пучки отделяются друг от друга тонкими перегородками, слоями неоформленной соединительной ткани (эндотенон). Основным компонентом этих перегородок, как и внешней оболочки сухожилия (эпитеиона), являются коллагеновые фибриллы (диаметром 20–200 нм) [47]. Кровеносные сосуды и жировые клетки обычно располагаются в участках соединения эпитеиона и эндотенона.

Как и в коллагеновых волокнах склеры, разброс диаметров коллагеновых фибрилл во вторичном сухожильном пучке является большим (рисунок 1.6). В одном пучке могут соседствовать фибриллы с диаметром от ~20 до ~500 нм [47]. Для сухожилий характерны бимодальные распределения диаметров коллагеновых фибрилл, например, в пучке основную массу фибрилл могут составлять относительно крупные фибриллы диаметром 150–250 нм и мелкие фибриллы диаметром 50–80 нм [24].

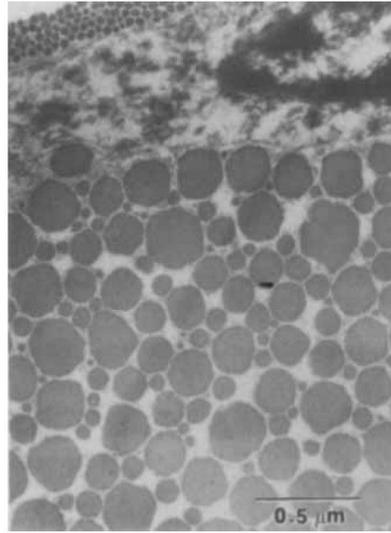


Рисунок 1.6. Изображение поперечного среза вторичного пучка сухожилия хвоста крысы, полученное с помощью электронной микроскопии (ТЭМ) [47].

Коллагеновые фибриллы ориентированы преимущественно вдоль продольной оси сухожилия [51]. Соседние фибриллы идут по большей части параллельно друг другу. В небольшой доле присутствуют и области, где фибриллы переплетаются [51].

В свободном состоянии коллагеновым пучкам характерен волнистый ход волокон, что хорошо видно на продольных срезах пучков в поляризованном свете [46]. Поскольку коллагеновые волокна проявляют двулучепреломление, волнистость структуры приводит к появлению ярких и темных полос на изображениях сухожильных пучков, получаемых с помощью поляризационной микроскопии. Такие полосы систематически появляются и исчезают при вращении скрещенных поляризаторов или при вращении образца. Как было показано в работе [52], волнистость структуры волокон исчезает при растяжении сухожилия. В этой работе на примере сухожильных пучков из хвоста крысы было показано, что растяжения образца на 4% относительно его первоначальной длины достаточно для устранения волнистости структуры.

Среди коллагенсодержащих биотканей сухожилия характеризуются самым высоким нормальным содержанием коллагена – 24–38% от общей массы ткани [43–45, 50]. Содержание воды в сухожилии в нативном состоянии – 55–72 мас.%. Подавляющую часть коллагена, присутствующего в первичных и вторичных сухожильных пучках, составляет коллаген типа I (~90%); при этом практически весь коллаген содержится в фибриллах [50]. Также в сухожилиях присутствует небольшое количество эластиновых волокон (~2% от сухого веса) [43].

Большую часть неводной составляющей межфибриллярной жидкости в коллагеновых волокнах составляют протеогликаны. Содержание гликозаминогликанов в сухожилиях существенно уменьшается по мере развития организма [53]. В работе [53] общее содержание сульфатированных гликозаминогликанов в сухожилиях хвоста крысы у новорожденных и зрелых особей крыс было оценено соответственно как 4,1 мг/г и 0,65 мг/г относительно сухого веса сухожилия. Также в работе [53] представлены данные показывающие, что удельное содержание коллагена в сухожилии увеличивается с возрастом. В работе [54] среднее содержание гликозаминогликанов в сухожилии хвоста взрослой крысы было оценено как $2,42 \pm 0,13$ мг/г относительно сухого веса.

1.2 Поперечные сшивки между молекулами коллагена.

Методы кросслинкинга коллагена

Образование поперечных ковалентных сшивок между молекулами коллагена происходит естественным путем во время развития и жизнедеятельности организма. В большом числе сшивки образуются при формировании коллагеновых фибрилл. Формирование коллагеновых фибрилл из молекул коллагена идет за счет образования внутри- и межмолекулярных сшивок с участием фермента лизилоксидазы. Под действием фермента происходит окисление и дезаминирование остатков лизина с образованием альдегидной группы, что приводит к возможности образования ковалентных связей между радикалами лизина соседних молекул коллагена [55]. Эти межмолекулярные связи стабилизируют структуру фибриллы. Увеличение жесткости и потерю эластичности коллагенсодержащей ткани с возрастом связывают с увеличением количества поперечных сшивок в ткани, возникающих в результате взаимодействия молекул коллагена с низкомолекулярными углеводами [56–59]. Образование поперечных связей происходит в результате реакции, называемой гликированием (неферментативным гликозилированием), которая происходит между низкомолекулярными восстанавливающими углеводами и аминокетонами белков [60]. Первоначально взаимодействие моносахаридов с аминокетонами коллагена (лизила и гидроксизила) приводит к образованию оснований Шиффа, которые модифицируются в более стабильные продукты Амадори [55]. Последующие, часто длительные, трансформации продуктов Амадори приводят к образованию так называемых конечных продуктов гликирования, некоторые из которых дают поперечные сшивки между белковыми молекулами [60, 61]. Повышенное количество конечных продуктов гликирования часто встречается у больных диабетом [62, 63]. Замечено, что люди

с сахарным диабетом значительно менее восприимчивы к развитию кератоконуса (патологическое растяжение роговицы), что обусловлено большей степенью поперечной связанности коллагена роговицы [63].

Применение химических агентов [1, 10, 62, 64–75], УФ-облучения [62, 64, 65, 67] или облучения в присутствии сенсibilизатора (фотохимическое воздействие) [1–4, 11, 62, 69, 74, 76–109] позволяет целенаправленно увеличить количество поперечных сшивок между высокомолекулярными составляющими коллагенсодержащей ткани (увеличить уровень поперечной связанности) для увеличения ее механической прочности [1–4, 62, 73, 80, 104, 110] и лежит в основе существующих методов кросслинкинга коллагена (Collagen Crosslinking, CXL) [83, 89, 99, 100, 105, 108, 111]. В медицине в основном находят применение химические и фотохимические методы кросслинкинга коллагена. Фотохимические методы кросслинкинга коллагена широко используются для укрепления роговицы при кератэктазиях [74, 89, 104, 107, 108], и в настоящее время проводятся исследования возможностей применения кросслинкинга для улучшения механических свойств склеры при прогрессирующей миопии [1–4, 38, 74, 112, 113]. Для тех же целей используются и химические методы сшивания [66, 68, 71, 73, 74]. Обзор химических методов сшивания коллагена можно найти в работах [24, 60, 65–68, 70, 71, 73, 74]. Среди наиболее известных реагентов, используемых для химического кросслинкинга коллагена, можно назвать глутаральдегид, глицеральдегид, дифенилфосфорил, генипин [24, 66, 68, 73]. Для терапевтического химического кросслинкинга коллагена склеры российскими учеными был разработан специальный препарат Склератекс (комплекс аминокислот в виде сукцинатов и соль меди) [70, 74]. В фотохимических методах кросслинкинга сшивки образуются в ходе фотоокислительной реакции с участием фотосенсибилизирующего красителя и возбуждающего излучения длиной волны, соответствующей пику поглощения красителя. В литературе оценивалась эффективность и безопасность разных вариантов фотохимического кросслинкинга, с разным выбором красителя и возбуждающего излучения. Наиболее известными являются сочетания бенгальского розового и зеленого света [101, 103], рибофлавина и ультрафиолета [1–4, 62, 74, 80, 89, 104, 108, 112], рибофлавина и синего света [102, 114]. Особое внимание уже долгое время привлекает к себе вариант кросслинкинга, в котором для формирования сшивок используется рибофлавин как сенсibilизатор и ультрафиолетовое излучение с длиной волны 370 нм. По сравнению с химическим сшиванием фотохимическое сшивание является более точной по локализации и степени воздействия процедурой [1]. Образование поперечных сшивок происходит только в областях ткани, повергнутых облучению, что позволяет изменять механические свойства ткани локализовано, только в нужных участках.

Большинство практически применяемых методов оценки эффективности процедур кросслинкинга коллагена биотканей основано на измерении параметров, характеризующих механические свойства ткани. В основополагающих работах по рибофлавин/УФ кросслинкингу коллагена роговицы и склеры механические свойства ткани оценивались стандартным способом по кривым зависимости "напряжение – относительное удлинение" и значениям разрывного напряжения, полученным при одноосном растяжении полосок ткани с помощью промышленных тестеров биоматериалов (одноосная экстензометрия) [1–4, 62, 66, 68, 70, 73, 74, 80, 104, 115]. Наряду с одноосной экстензометрией для характеристики механических свойств ткани используется и двуосная экстензометрия [60, 87, 116–118]. Для оценки эффективности процедур кросслинкинга коллагена роговицы *in vivo* в клинических условиях в настоящее время используются промышленные офтальмологические приборы, позволяющие оценивать такие параметры, как корнеальный гистерезис и фактор резистентности роговицы, условные величины, характеризующие вязкоупругие свойства ткани [117, 119]. В плане *in vivo* оценки стандартных механических характеристик ткани значительный интерес представляют методы измерения с регистрацией пространственных смещений с помощью голографической интерферометрии [120, 121], спекл-интерферометрии [122, 123] и ОКТ [116, 124, 125], а также метод бриллюэновской спектроскопии [126, 127].

Одним из широко используемых показателей увеличения уровня поперечной связанности коллагена ткани является увеличение температуры его денатурации [65, 66, 68, 70, 71, 74, 75, 87, 99–101, 128–130]. Увеличение количества межмолекулярных связей приводит к увеличению температуры денатурации, что используется для оценки эффективности сшивания [66, 68, 70, 71, 74, 75, 100, 101, 129, 130]. Для определения температуры денатурации обычно используется метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Также для определения степени поперечной связанности коллагенсодержащих тканей используются биохимические методы, основанные на оценке резистентности ткани к действию протеолитических ферментов [65, 66, 68, 71, 82, 87, 100, 108, 111, 118, 128, 131–135], которая увеличивается с увеличением количества сшивок между молекулами коллагена.

1.2.1 Применение рибофлавин/УФ кросслинкинга для укрепления роговицы при кератэктазиях

Первое упоминание о возможности укрепления роговицы при кератэктазиях (и, в частности, при кератоконусе) посредством воздействия на роговицу раствора рибофлавина и ультрафиолетового излучения встречается в работе [62] (Т.Сейлер и др.). В этой работе

оценивалось изменение механических свойств роговицы *in vitro* после воздействия на ткань 0,5% раствора рибофлавина и ультрафиолетового излучения (длина волны 365 нм), только ультрафиолетового излучения (длина волны 254 нм), только 0,5% раствора рибофлавина, а также после обработки ткани химическими веществами, растворами глутаральдегида разной концентрации и 0,1% раствором Карновского. Результаты данной работы показали, что рибофлавин/УФ кросслинкинг дает значительный эффект (сравнивались механические свойства роговицы при одноосном растяжении), приводя к большему повышению жесткости роговицы, чем только световое воздействие, и несколько меньшему, чем химическое сшивание.

В 2003 году в работе [89] сотрудниками той же научной группы были впервые представлены результаты клинического применения рибофлавин/УФ фотосшивания для лечения прогрессирующего кератоконуса. Через 3–47 месяцев после процедуры кросслинкинга с помощью кератометра проводились измерения кривизны передней поверхности роговицы. В 72% случаев у пациентов было отмечено прекращение прогрессирования кератоконуса после фотосшивания и уменьшение кривизны поверхности роговицы.

На основе первого клинического исследования [89] был разработан стандартный протокол рибофлавин/УФ кросслинкинга, получивший название "дрезденский протокол", который в настоящее время широко применяется в медицинской практике для лечения кератоконуса. Этот стандартный протокол включает следующие основные этапы: 1) удаление эпителиального слоя с обрабатываемой области роговицы, 2) пропитывание стромы роговицы водным раствором рибофлавина (0,1%) и декстрана (20%) в течение 30 минут, 3) облучение ультрафиолетовым излучением мощностью 3 мВт/см² в течение 30 минут с одновременными инстилляциями раствора рибофлавина. Присутствие декстрана в растворе рибофлавина, используемого для пропитывания роговицы, предотвращает набухание ткани (и, более того, приводит к частичной дегидратации ткани [108]).

Процедура рибофлавин/УФ кросслинкинга по дрезденскому протоколу подразумевает удаление эпителиального слоя роговицы. Необходимость удаления эпителия или повышения его проницаемости для рибофлавина для достижения значимого эффекта фотосшивания убедительно доказана в работах [79, 80, 92]. В работе [92] проводилось сравнение интрастромальной концентрации рибофлавина в образцах роговицы человека, пропитывавшихся раствором рибофлавина без удаления эпителиального слоя и после удаления эпителия. Оценка концентрации рибофлавина осуществлялась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Конечная средняя концентрация рибофлавина в образцах с эпителием оказалась в 100 раз меньше, чем в образцах без эпителия. В работе [79] было показано, что даже при повреждениях эпителия, если эти повреждения не затрагивают базальный слой, проницаемость

эпителиального слоя для рибофлавина может оставаться очень малой. Измерения в этой работе проводились *in vitro* на образцах роговицы свиньи; интрастромальное содержание рибофлавина оценивалось по спектрам пропускания роговицы.

Удаление эпителиального слоя роговицы сопровождается болевыми ощущениями и может приводить к развитию воспалительных процессов. В связи с этим значительные усилия были направлены на поиск способов, позволяющих осуществлять УФ/рибофлавин кросслинкинг без удаления эпителия, трансэпителиально. Большинство предложенных трансэпителиальных методов фотосшивания предполагают использование специальных химических агентов – пенетраторов, способствующих ослаблению плотного соединения эпителиальных клеток роговицы и улучшению проницаемости эпителия для рибофлавина [80–82, 136]. Вещества, способные выполнять функцию пенетраторов, такие как бензалкония хлорид, широко используются в офтальмологии. Бензалкония хлорид часто входит в состав глазных капель, используемых для анестезии. В качестве перспективных методов трансэпителиальной доставки рибофлавина в строму роговицы также рассматриваются ионофорез и фонофорез [77, 78, 136]. Также развиваются методы доставки рибофлавина предполагающие частичное нарушение целостности эпителиального слоя, менее травматичное, чем в стандартной методике [87, 100, 137].

В настоящее время развиваются методики фотосшивания, предполагающие более быстрое проведение процедуры кросслинкинга за счет повышения интенсивности УФ-облучения [87, 100]. Идея ускоренного кросслинкинга (accelerated CXL) основана на законе взаимозаместимости Бунзена – Роско, согласно которому концентрация продуктов фотохимической реакции пропорциональна дозе излучения, поглощенного светочувствительным веществом вне зависимости от мощности применяемого излучения и времени [138]. Однако, как показали недавние эксперименты [115, 139–141], в случае рибофлавин/УФ фотосшивания закон взаимозаместимости не является достаточно точным для расчета необходимого времени экспозиции.

1.2.2 Химические механизмы образования поперечных связей при рибофлавин/УФ кроссликинге

При возбуждении излучением УФ-А диапазона рибофлавин проявляет свойства фотосенсибилизатора образования межбелковых ковалентных сшивок, осуществляемых через аминокислотные остатки сердцевинных белков протеогликанов и коллагена. Вопрос о том, какие аминокислотные остатки учувствуют в процессе образования поперечных связей и где

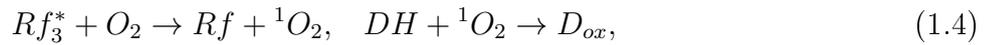
Под действием ультрафиолетового излучения, молекулы рибофлавина переходят в возбужденное синглетное состояние Rf_1^* (время жизни состояния 10^{-8} с) [98]. Посредством интеркомбинационной конверсии они могут далее перейти в возбужденное триплетное состояние Rf_3^* (время жизни состояния 10^{-2} с) [98]:



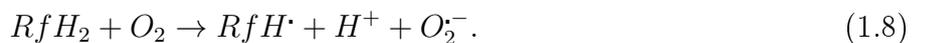
При малых концентрациях кислорода, реакция между белками и возбужденным рибофлавином преимущественно происходит по типу I. Этот процесс начинается с переноса электрона от аминокислотного остатка белка DH на возбужденную молекулу рибофлавина в состоянии Rf_3^* , что приводит к образованию радикалов рибофлавина RfH^\cdot и радикалов аминокислот D^\cdot . Радикалы аминокислот могут реагировать с радикалами аминокислот другой коллагеновой молекулы, формируя межмолекулярные поперечные связи $D - D$:



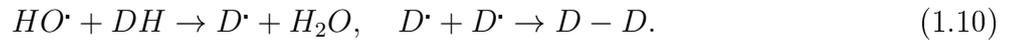
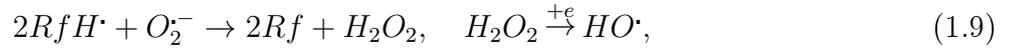
При реакции типа II молекула Rf_3^* взаимодействует с молекулой кислорода в основном (триплетном) состоянии с образованием синглетного кислорода 1O_2 . Взаимодействие синглетного кислорода с аминокислотными остатками коллагена DH приводит к образованию окисленных форм аминокислот D_{ox} , которые далее участвуют в образовании сшивок:



Образовавшиеся в результате реакции I типа радикальная RfH^\cdot и восстановленная RfH_2 формы рибофлавина (лейкофлавины) могут взаимодействовать с кислородом с образованием супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$:



Супероксид $O_2^{\cdot-}$ может являться источником других, активных форм кислорода, таких как пероксид водорода H_2O_2 и гидроксильный радикал HO^{\cdot} , которые, взаимодействуя с аминокислотами коллагена DH , могут способствовать образованию сшивок $D - D$:



1.2.3 Концентрация рибофлавина в ткани при фотосшивании

Важной характеристикой, определяющей эффективность процедуры рибофлавин/УФ кросслинкинга, является концентрация рибофлавина в ткани и ее зависимость от глубины [140, 143–153]. Если пропитывание роговицы раствором рибофлавина осуществляется в соответствии с дрезденским протоколом, при удаленном эпителии и концентрации рибофлавина в растворе 0,1%, в течение 30 минут средняя массовая концентрация рибофлавина в ткани после этой процедуры составляет 0,012–0,020% [140, 145, 151]. При очень большом времени пропитывания (порядка 6 часов) она может достигать 0,033% [140]. Согласно данным работы [153] при пропитывании 0,1% раствором рибофлавина деэпителизированной роговицы свиньи, средняя концентрация рибофлавина во фронтальном пласте ткани толщиной 500 мкм через 5, 10 и 20 минут от начала пропитывания составляет соответственно порядка 62, 76 и 91% относительно средней концентрации рибофлавина в этом пласте, достигаемой при 30-минутном пропитывании. Экспериментальные оценки распределения рибофлавина по толще роговицы на разных стадиях процедуры фотосшивания приводятся в работах [140, 143, 144, 146–151].

При оценке влияния концентрации рибофлавина на эффективность фотосшивания важно учитывать возможную агрегацию молекул Rf и RfH_2 [87, 154]. При больших концентрациях Rf и RfH_2 эти молекулы имеют тенденцию агрегировать с образованием димеров $2Rf$ и $2RfH_2$, а также смешанных димеров $RfRfH_2$ [87]. С увеличением концентрации раствора рибофлавина будет увеличиваться относительное количество таких димеров. Образование димеров приводит к уменьшению количества мономерного рибофлавина, способного участвовать в образовании фотосшивок, в силу этого при повышении общей концентрации рибофлавина эффективность (квантовый выход) образования сшивок может снижаться [154].

В настоящее время общепризнано, что при разработке и оценке эффективности процедур кросслинкинга роговицы важно учитывать изменения концентрации рибофлавина и молекулярного кислорода в ткани, происходящие при УФ-обработке, и изменения оптиче-

ских свойств ткани в УФ-А области (на длине волны УФ-обработки), обусловленные химическими превращениями рибофлавина и его производных [133, 147, 155–161]. При этом важен учет как конечных продуктов фотодегградации рибофлавина, таких как люмихром, люмифлавин, циклодегидрорибофлавин (cyclohydroriboflavin, CDRF), карбоксиметилфлавин (carboxymethylflavin, CMF) [162–164], так и промежуточных продуктов таких как лейкофлавин (1,5-дигидрорибофлавин, RfH_2 (рис. 1.7, формулы (1.6), (1.8))) и формилметилфлавин (formylmethylflavin, FMF,) [165]. Оптические свойства указанных веществ в большей или меньшей степени отличаются от свойств рибофлавина. В частности, это касается спектров коэффициентов экстинкции. Поэтому изменение содержания рибофлавина и указанных фотопродуктов в ткани во время облучения может приводить к существенному изменению распределения интенсивности УФ-излучения по глубине ткани, влияя на эффективность кросслинкинга [133, 156, 160] (см. раздел 3.3).

1.2.4 Локализация сшивок

Факт образования сшивок между коллагеновыми молекулами в результате СХЛ является твердо установленным. Однако по настоящее время остаются открытыми множество вопросов, касающихся локализации сшивок. В частности, актуальными являются следующие вопросы:

- В какой области фибрилл наиболее вероятно образование сшивок между молекулами коллагена (только ли в приповерхностной области фибриллы или внутри фибриллы тоже)?
- Могут ли образовываться связи между молекулами коллагена разных фибрилл?
- Происходит ли образование связей между молекулами коллагена и протеогликанами?
- Может ли происходить образование межфибриллярных сшивок, путем образования связей между молекулами коллагена и протеогликанами, прикрепленными к соседним фибриллам?

Возможные варианты образования сшивок представлены на рисунке 1.8

Для определения локализации сшивок проводились эксперименты по набуханию ткани после процедуры кросслинкинга [91, 108]. То, что поперечные связи способны влиять на свойства набухания ткани, было показано ранее на примере искусственных коллагеновых мембран [166]. В работе [166] сшивки создавались химически, без фотовоздействия. Было

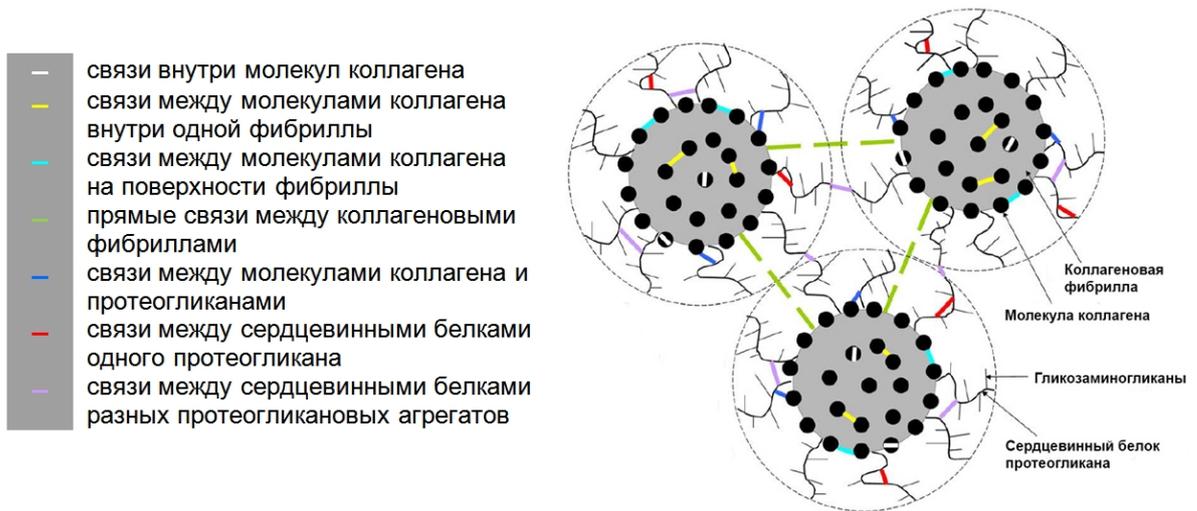


Рисунок 1.8. Возможные варианты образования сшивок в результате кросслинкинга [108].

показано, что кросслинкинг приводит к снижению степени набухания коллагеновых пленок. Пониженная степень набухания образцов после процедуры кросслинкинга говорит о возможности образования прямых межфибриллярных поперечных связей [108, 166]. В работе [108] на основе анализа экспериментальных данных было высказано предположение, что связи между сердцевинными белками протеогликанов и молекулами коллагена, образующиеся в результате фотосшивания, также могут влиять на свойства набухания ткани, предотвращая отрыв протеогликанов от фибрилл. В экспериментах по набуханию образцов роговицы после воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения [108] не было замечено различий в степени набухания между нативными образцами роговицы и образцами, подвергнутыми фотосшиванию. Эти данные находятся в противоречии с выводами работы [91], где утверждается, что степень набухания роговицы во влажной камере уменьшается после рибофлавин/УФ кросслинкинга. В статье [108] высказано предположение, что это отличие связано с присутствием в образцах, подвергнутых набуханию [91], значительного количества рибофлавина и декстрана – рибофлавин и декстран не вымывались из образцов перед экспериментами по набуханию или в ходе этих экспериментов. В экспериментах, описанных в [108], набухание образцов проходило в физиологическом растворе, который периодически заменялся, что приводило к постепенному вымыванию рибофлавина и декстрана из образцов. Основываясь на результатах своих рентгеноструктурных измерений, авторы работы [108] пришли к заключению, что поперечные связи в ходе фотосшивания вероятнее всего возникают 1) внутри молекул коллагена и между молекулами коллагена у поверхности фибрилл (только в приповерхностной области фибриллы), 2) между сердцевинными белками протеогликанов, прикрепленных к одной и той же фибрилле или к соседним фибриллам, и 3) между сердце-

винными белками протеогликанов и фибриллярным и нефибриллярным коллагеном (нефибриллярный коллаген присутствует в межфибриллярном веществе). Увеличением количества сшивок такого рода можно объяснить повышение жесткости ткани и ее устойчивости к воздействию протеолитических ферментов после фотосшивания [83, 99, 100, 108].

Данные рентгеноструктурного анализа [108] не показали значимого изменения в диаметре коллагеновых фибрилл после процедуры фотосшивания, тогда как ранее опубликованные данные электронно-микроскопического анализа [109, 167] говорили о существенном увеличении диаметра фибрилл. Авторы работы [108] высказали предположение, что различие в среднем диаметре фибрилл на электронно-микроскопических изображениях для сшитых и несшитых образцов связано с дегидратацией ткани при подготовке срезов для электронно-микроскопических исследований и отражает разную степень гидратации фибрилл и их протеогликановых оболочек в приготовленных для электронной микроскопии срезах сшитых и несшитых образцов.

1.2.5 Применение рибофлавин/УФ кросслинкинга для модификации свойств склеры

В настоящее время проводятся многочисленные исследования, направленные на изучение возможностей использования рибофлавин/УФ кросслинкинга для модификации механических свойств склеры, в частности, при лечении миопии [1–4, 74, 99, 112].

Детальное изучение биомеханических изменений склеры в результате кросслинкинга было проведено в работе [1], в которой различные методики фотохимического и химического кросслинкинга применялись к образцам склеры человека и свиньи *in vitro*. В этой работе были рассмотрены два варианта создания фотосшивок: 1) с использованием УФ-А излучения с сенсбилизацией рибофлавином и 2) с использованием широкополосного излучения видимого диапазона с сенсбилизацией раствором бенгальского розового. В первом случае образцы помещались в 0,1% раствор рибофлавина, содержащий декстран, на 10 минут и облучались излучением с длиной волны 370 нм в течение 30 минут при плотности облучения 3 мВт/см^2 (световая доза $5,4 \text{ Дж/см}^2$). Во втором случае образцы помещали в раствор бенгальского розового на 10 минут и облучали излучением от источника белого света в течение 1 часа. Также были реализованы четыре методики формирования химических сшивок: 1) инкубация в течение 5 дней в минимальной среде Игла (Minimal Essential Medium, MEM) с раствором глицеральдегида (0,2 М), 2) инкубация в течение часа в растворе глицеральдегида (0,1%), 3) инкубация в течение 1 недели в MEM с раствором рибозы (0,5 М) и 4) инкубация в

течение 1 недели в МЕМ с раствором глюкозы (0,5 М). В качестве образцов использовались полоски склеры размером 4 мм на 8 мм, вырезанные из экваториальной области глазного яблока в сагиттальном направлении. Измерение биомеханических свойств склеры осуществлялось с помощью тестера биоматериалов Minimat (Rheometric Scientific GmbH, Germany). Образец растягивался со скоростью 1,5 мм/мин до достижения механического напряжения $\sigma = 3,5$ МПа. Полученные в работе [1] зависимости "напряжение – относительное удлинение" (диаграммы напряжений при растяжении) для склеры свиньи и человека приведены на рисунке А.1 в приложении А. Для оценки эффективности модификации механических свойств склеры с помощью различных методик кросслинкинга сравнивались значения, для контрольных и обработанных образцов, таких характеристик, как механическое напряжение, необходимое для 8% растяжения образца, и модуль Юнга (Е), определяемый по наклону кривой зависимости напряжения σ от относительного удлинения ε , для 8% растяжения образца. Полученные в работе [1] значения механического напряжения и модуля Юнга при 8% относительном удлинении образцов в нативном состоянии и после процедур сшивания с использованием рассматриваемых методик представлены в таблице А.1 в приложении А. Наблюдалось существенное увеличение жесткости склеры свиньи и человека после сшивания с помощью глутаральдегида и глицеральдегида, а также после рибофлавин/УФ фотосшивания. Сравнение с контрольными образцами показало, что для склеры человека эффект увеличения жесткости от применения любого из этих трех методов кросслинкинга является значительно меньшим, чем для склеры свиньи. Фотосшивание с использованием бенгальского розового не дало значительного эффекта, возможно из-за медленной диффузии этого красителя в склеру. Использование рибозы и глюкозы для создания сшивок также показало себя малоэффективным.

В работе [4] проведено сравнение биомеханического эффекта рибофлавин/УФ кросслинкинга для образцов склеры кролика, свиньи и человека. Кросслинкинг осуществлялся следующим образом: образцы (размером 3,5 мм на 15 мм) помещали в 0,1% раствор рибофлавина на 15 минут и затем облучали излучением с длиной волны 365 нм в течение 40 минут при плотности облучения 3 мВт/см^2 . После кросслинкинга образцы растягивали, линейно увеличивая нагрузку со скоростью 2 мм/мин, до разрыва ткани (Instron 5544 system; Instron Co. Ltd., USA). Модуль Юнга рассчитывался по производной зависимости $\sigma(\varepsilon)$ при относительном удлинении 4%, 6% и 8%. В контрольной (без обработки) группе при 8% растяжении значение модуля Юнга составило $2,88 \pm 1,55$ МПа, $4,46 \pm 4,09$ МПа и $14,31 \pm 8,56$ МПа ($n = 16$) для образцов склеры свиньи, кролика и человека, соответственно, то есть, в исходном состоянии образцы склеры человека имели большую биомеханическую жесткость, чем

образцы склеры свињи и кролика, что коррелирует с данными работы [1] (см рис. А.1). На рисунке 1.9 показаны полученные значения модуля Юнга при различном удлинении. После процедуры рибофлавин/УФ кросслинкинга среднее значение модуля Юнга при 8% растяжении для образцов склеры свињи, кролика и человека составило соответственно $3,22 \pm 1.46$ МПа, $9,51 \pm 5.23$ МПа и $16,28 \pm 7.33$ МПа ($n = 16$). Существенным увеличением модуля Юнга после фотосшивания оказалось только для образцов склеры кролика (на 113–264 %). Авторами [4] было высказано предположение о том, что различие в эффективности кросслинкинга для склеры разных видов связано с различием в прозрачности стромы склеры для ультрафиолетового излучения, обусловленным особенностями ультраструктуры и состава ткани.

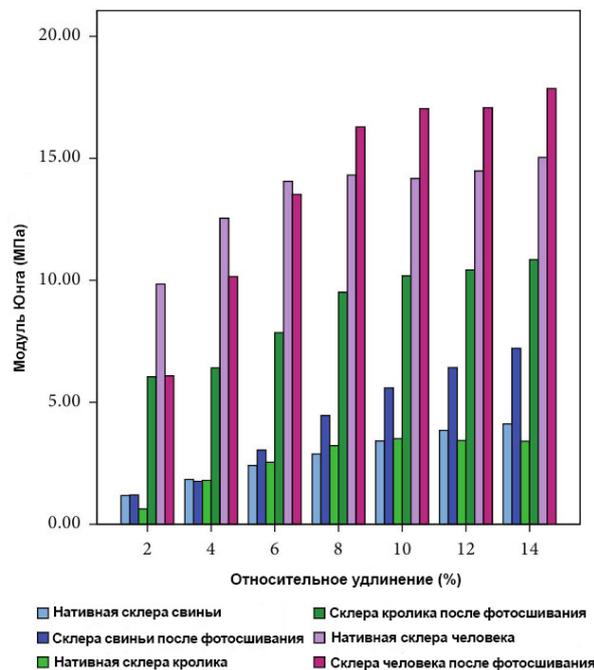


Рисунок 1.9. Значения модуля Юнга склеры свињи, кролика и человека [4].

Важным аспектом является устойчивость образовавшихся в результате фотосшивания межмолекулярных связей в процессе обмена веществ в живом организме. Исследование долгосрочности биомеханического эффекта сшивания в условиях *in vivo* было проведено в работе [2]. Эксперименты проводились на кроликах. После надреза мышц, втягивающих глазное яблоко, а также верхних косых мышц, левое глазное яблоко поворачивали так, чтобы было возможно облучить заднюю область глаза. Правый глаз являлся контрольным. Фотосенсибилизирующий 0,1% раствор рибофлавина в физиологическом растворе наносили на глаз за 5 минут до и каждые 5 минут во время облучения. Излучением с длиной волны 370 нм и плотностью 3 мВт/см^2 облучали участок образца площадью $10 \times 10 \text{ мм}^2$ в течение 30 минут. Биомеханические измерения проводились через 3 дня, 4 месяца и 8 месяцев после облучения.

Из облученного глазного яблока в сагиттальном направлении вырезались полоски размером 4 мм на 10 мм. Механические свойства образцов измерялись с помощью тестера биоматериалов Minimat 2000. Нагрузку линейно увеличивали со скоростью 1 мм/мин до разрыва ткани. Модуль Юнга (E) рассчитывался по углу наклона кривой зависимости напряжения (σ) от относительного удлинения (ε) при $\varepsilon = 50\%$. Было отмечено значительное увеличение жесткости ткани шитых образцов склеры по сравнению с контрольными. Значение модуля Юнга обработанных образцов оказалось выше исходного на 320,4% для образцов, взятых через 3 дня после облучения, и на 277,6% и 502% для образцов, взятых через 4 месяца и 8 месяцев после облучения, соответственно. Таким образом, это исследование показало сильное увеличение биомеханической жесткости склеры с сохранением эффекта, по крайней мере, в течение 8 месяцев. Каких-либо повреждений сетчатки в обработанных образцах не было зафиксировано.

Основные физиологические и медицинские факторы, которые должны учитываться при разработке клинических методик кросслинкинга склеры для лечения миопии, и возможные негативные последствия кросслинкинга обсуждаются в работе [168]. В частности, в этой работе замечено, что кросслинкинг может приводить к сшиванию коллагена в стенках кровеносных сосудов, пронизывающих склеру, и отмечена важность оценки негативных последствий этого и выработки соответствующих превентивных и послеоперационных мер.

1.3 Оптическое просветление склеры

Большинство биологических тканей являются сильно рассеивающими. Основной причиной рассеяния света в биотканях является различие в значениях показателей преломления компонентов биоткани, например, показателей преломления внутритканевой жидкости и коллагеновых фибрилл в коллагенсодержащих тканях [169]. Рассеяние света в биологических тканях во многих случаях можно существенно уменьшить, используя осмотически активные иммерсионные жидкости (просветляющие агенты) [169–171]. Среди основных факторов, приводящих к уменьшению рассеяния, указываются 1) выход воды из межфибриллярного пространства ткани (дегидратация) и 2) проникновение оптических просветляющих веществ в ткань. Проникновение в биоткань иммерсионной жидкости, имеющей показатель преломления больший, чем у внутритканевой жидкости, приводит к выравниванию показателей преломления рассеивателей и окружающей их среды, и, как следствие, значительному снижению светорассеяния [169–171].

Эксперименты показывают, что применение оптических просветляющих агентов к склере приводит к значительному уменьшению рассеяния света в ткани в видимом и инфракрасном диапазонах [5, 6, 169–174]. В работе [171] были оценено влияние оптического просветления образцов бычьей склеры *in vitro* на коллимированное пропускание образцов. В качестве иммерсионных растворов использовались 76% и 60% водный растворы тразографа, 45% водный раствор глюкозы и 80% растворы полиэтиленгликоля (ПЭГ-20000 и ПЭГ-6000). Коллимированное пропускание образцов склеры в нативном состоянии в диапазоне от 400 до 500 нм составляло менее 1–2%, а ближнем ИК-диапазоне – 6–30% в зависимости от толщины и пигментации образца. Максимальное значение коллимированного пропускания образцов при их просветлении в 60% растворе тразографа составило 13% на длине волны 450 нм и 76% на длине волны 700 нм, в случае 76% раствора тразографа – 39% (450 нм) и 99% (700 нм), в случае 45% раствора глюкозы – 22% (450 нм) и 73% (700 нм) и в случае раствора ПЭГ-20000 – 46% (450 нм) и 99% (700 нм). Таким образом, выдерживание образцов склеры в иммерсионных жидкостях приводило к большему увеличению коллимированного пропускания образцов для больших длин волн.

В работе [172] оценивалась эффективность иммерсионного оптического просветления склеры человека. Измерения проводились в видимом диапазоне. На рисунке 1.10 представлены спектры коллимированного пропускания образца склеры, полученные при его выдерживании в 40% водном растворе глюкозы. И в данном случае авторами было отмечено тот факт, что оптическое просветление образцов склеры дает больший эффект в области больших длин волн.

В работах [5, 172, 173] представлены результаты экспериментального исследования изменений оптических свойств склеры кролика в условиях *in vivo* при поверхностном нанесении 40% водного раствора глюкоза на склеру глазного яблока. На рисунке 1.11 показаны представленные в [5] спектры отражения склеры кролика, измеренные *in vivo* в различные моменты времени после добавления раствора глюкозы. Было отмечено значительное уменьшение отражательной способности образцов в течение первых 5 мин после нанесения глюкозы. Более низкую отражательную способность склеры на длинах волн 420, 530 и 570 нм авторы этой работы объясняют поглощением света кровью сосудистой системы склеры. Было отмечено, что воздействие раствора глюкозы на поверхность глаза может вызывать раздражение склеры, приводящее к дополнительному поступлению крови в исследуемую область. В спектральной области 610–750 нм коэффициент отражения склеры кролика *in vivo* уменьшался через 30 минут после нанесения 40%-ого раствора глюкозы в 1,5 – 1,7 раза, а в области полос поглощения крови – более чем в 2 раза [5]. Время необходимое для достижения максимального

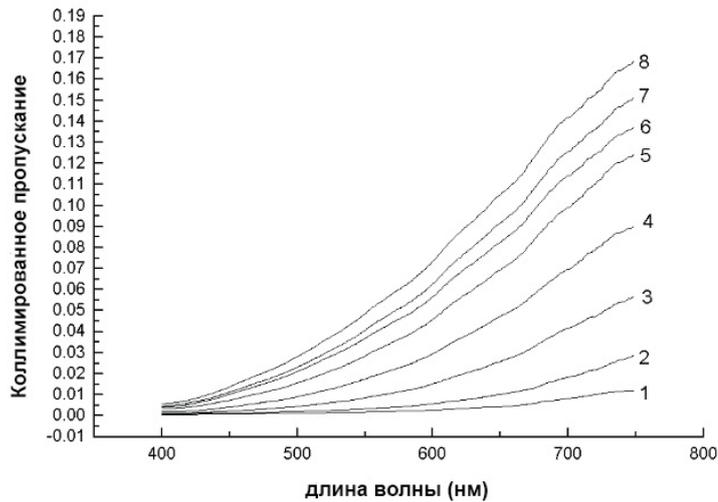


Рисунок 1.10. Спектры коллимированного пропускания образца склеры глаза человека, после нанесения 40% раствора глюкозы через 10 с (1), 1 мин (2), 2 мин (3), 3 мин (4), 4 мин (5), 5 мин (6), 6,5 мин (7) и 27 мин (8) после погружения образца склеры в раствор глюкозы [172].

просветления склеры при погружении образца (*in vitro*) в 40% раствор глюкозы составило 8-10 мин, а в случае нанесения этой иммерсионной жидкости на живую ткань (*in vivo*) — больше 20 минут. Такое различие авторы [5] объясняют 1) геометрией просветления — в *in vitro* экспериментах иммерсионный агент проникает в ткань с двух сторон образца, при *in vivo* — только с одной, 2) присутствием теноновой капсулы и конъюнктивы, препятствующей проникновению иммерсионной жидкости внутрь ткани в экспериментах *in vivo* (в *in vitro* экспериментах эти оболочки были удалены), и 3) вымыванием иммерсионного агента из биологической ткани за счет тканевого метаболизма. Как отмечено в [5], степень просветления склеры *in vivo* остается достаточно высокой, сравнимой со степенью просветления склеры *in vitro*.

Обратимость действия иммерсионных жидкостей была продемонстрирована в работе [174]. В этой работе отслеживалось изменение спектров диффузного отражения склеры *in vivo* под действием просветляющего агента и в процессе его вымывания из ткани физиологическим раствором. Измерения проводились в диапазоне длин волн 425–700 нм. В качестве иммерсионного агента использовался 100% глицерин, который вводился в склеру, посредством инъекции через конъюнктиву. На рисунке 1.12 представлены усредненные спектры отражения для разных моментов времени после введения глицерина (а) и с начала процедуры вымывания иммерсионного агента с помощью физиологического раствора (б). После вымывания иммерсионного агента оптические свойства ткани восстанавливались. На основе

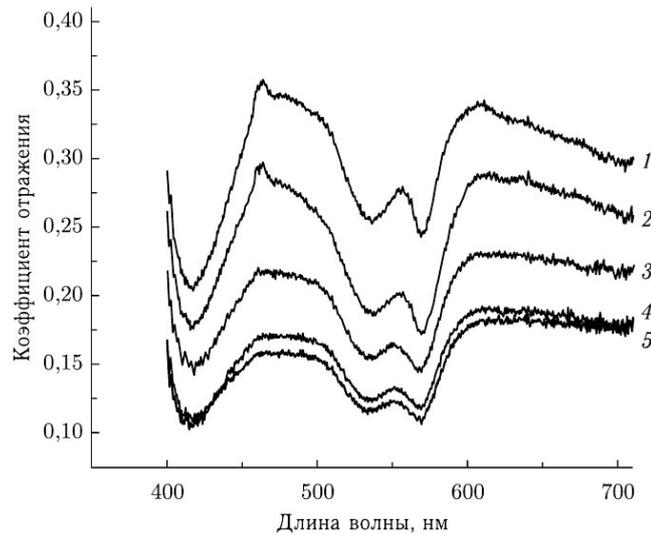


Рисунок 1.11. Спектры диффузного отражения образцов склеры глаза кролика *in vivo* после нанесения 40% раствора глюкозы через 1 мин (1), 4 мин (2), 21 мин (3), 25 мин (4) и 30 мин (5) [5].

этого авторами был сделан вывод об обратимости воздействия гиперосмотических просветляющих агентов на биоткань.

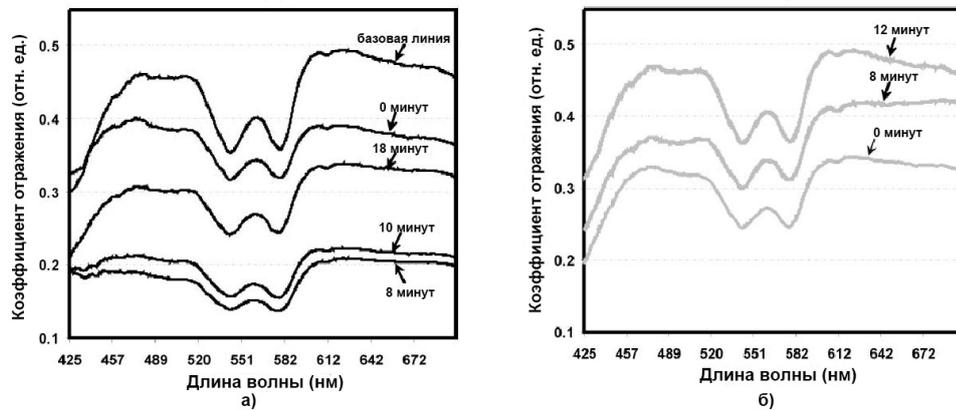


Рисунок 1.12. Спектры диффузного отражения склеры кролика. (а) – после инъекции глицерина, (б) – после нанесения физиологического раствора [174].

Судя по литературе, исследований оптического просветления склеры в ультрафиолетовой спектральной области практически не проводилось. В контексте настоящей работы эффективность иммерсионного оптического просветления ткани в этой спектральной области, в диапазоне длин волн 360–370 нм, представляет особый интерес, поскольку в рассматриваемом методе кросслинкинга сшивание коллагена осуществляется под действием излучения этого диапазона. Результаты проведенных в рамках настоящей работы исследований, направленных на оценку эффективности иммерсионного просветления склеры в указанном

диапазоне УФ области и выбор оптимальных условий иммерсионного просветления для проведения рибофлавин/УФ кросслинкинга, представлены в главе 2.

Глава 2

Влияние оптического просветления на эффективность метода упрочнения склеры, основанного на рибофлавин/УФ фотосшивании коллагена

В первой части данной главы (раздел 2.1) представлены результаты экспериментальных исследований, направленных на оценку влияния оптического просветления склеры, проводимого перед процедурой рибофлавин/УФ кросслинкинга, на механическую жесткость склеры. Известно, что применение оптических просветляющих агентов к склере приводит к значительному уменьшению рассеяния света склерой в видимом и инфракрасном диапазонах [5,6,169,171–174]. Исследований оптического просветления склеры в УФ-А области, как уже отмечалось, практически не проводилось. В ходе выполнения данной диссертационной работы было проведено экспериментальное сравнение эффективности различных просветляющих агентов в просветлении склеры кролика *ex vivo* в УФ-А диапазоне. Эффективность просветляющего действия оценивалась по степени увеличения коллимированного пропускания образцов склеры. В разделе 2.2 приведены экспериментальные оценки изменения механической жесткости склеры при использовании обычной процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания и фотосшивания с предварительным оптическим просветлением. Результаты исследований, представленных в данной главе, опубликованы в работах [9,175].

2.1 Оптическое иммерсионное просветление склеры в ультрафиолетовой области

Эксперименты по определению эффективности просветляющего действия различных иммерсионных агентов для склеры в ультрафиолетовой спектральной области проводились *ex vivo* на образцах склеры кролика и свиньи. Перед экспериментами склера тщательно очищалась от сосудистой оболочки, сетчатки и эписклерального слоя и разрезалась на образцы размером около $0,5 \times 1 \text{ см}^2$. Среднее значение толщины образцов в нативном состоянии склеры кролика и свиньи составляло 0,46 мм и 0,78 мм. В качестве просветляющих агентов использовались водные растворы глицерина с объемным содержанием глицерина 85%, 63,8% и 42,5%, водные растворы глюкозы концентрацией 54% и 40% по массе и полиэтиленгликоль ПЭГ-300. Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 2.1. Спектры коллимированного пропускания образцов в спектральном диапазоне 300–400 нм измерялись с помощью спектрометра UV-VIS USB4000 (Ocean Optics, США). Источником излучения служила галогенная лампа (источник Ocean Optics, HL-2000). Из спектра излучения, прошедшего через склеру, выделялась ультрафиолетовая область с помощью фильтра УФС6 с максимумом пропускания на длине волны 370 нм.

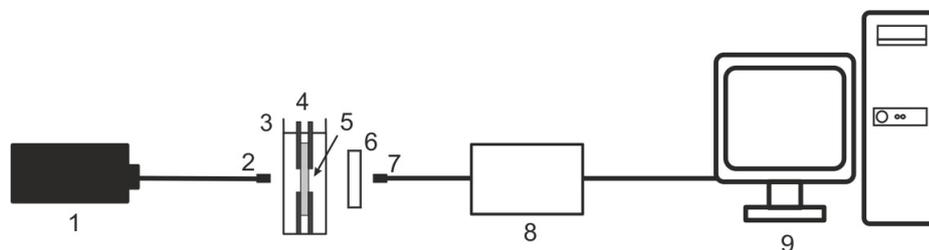


Рисунок 2.1. Схема экспериментальной установки измерения спектров коллимированного пропускания. 1– галогенная лампа HL-2000, 2 – оптическое волокно, подводящее излучение к образцу, 3 – кювета с иммерсионной жидкостью, 4 - зажим для закрепления образца склеры, 5 – образец склеры, 6 – фильтр УФС6, 7 – оптическое волокно, собирающее излучение, прошедшее через образец, 8 – спектрометр, 9 – персональный компьютер.

Для измерения коллимированного пропускания образец склеры закреплялся на рамке с отверстием $5 \times 5 \text{ мм}^2$ и помещался в кювету между двумя волоконно-оптическими кабелями (P400-1-UV-VIS, Ocean Optics, США). Одно волокно служило для доставки излучения к образцу, а другое – для сбора излучения, выходящего из образца под малыми углами к оси. Кювета с образцом заполнялась просветляющим агентом, и после этого, каждые 2–5 минуты, проводилась регистрация спектров пропускания образца в течение 25–60 минут после добавления иммерсионной жидкости.

Измеренные зависимости коэффициента коллимированного пропускания на длине волны 370 нм для образцов склеры кролика, просветляемых в водных растворах глицерина различной концентрации, от времени выдерживания образца в иммерсионной жидкости представлены на рисунке 2.2. Из представленных данных видно, что применение 42,5% раствора глицерина не привело к значительному увеличению прозрачности склеры на длине волны 370 нм. За 30 минут выдерживания образца в этом растворе коллимированное пропускание склеры увеличилось всего до 0,5%. С увеличением концентрации глицерина наблюдается увеличение эффективности просветляющего действия иммерсионного агента: применение 63,8% раствора увеличивает коллимированное пропускание склеры до 4,8% за 25 минут; применение 85% раствора – до 23,6% за 30 минут.

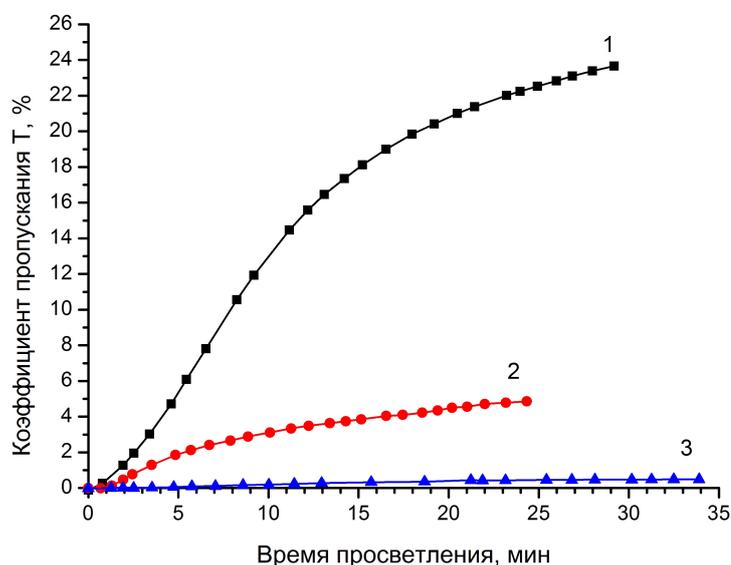


Рисунок 2.2. Изменение коэффициента коллимированного пропускания на длине волны 370 нм образцов склеры кролика при их просветлении в водных растворах глицерина различной концентрации (1– 85%, 2 – 63,8%, 3 – 42,5%).

Аналогичные данные для растворов глюкозы представлены на рисунке 2.3. Эффективность просветляющего действия растворов глюкозы оказалась невысока: в растворе концентрацией 54% коллимированное пропускание увеличилось за 35 минут с 0% до 1,4%, в растворе глюкозы концентрацией 40% за 45 минут – всего до 0,22%. Применение полиэтиленгликоля не привело заметному к увеличению прозрачности склеры на длине волны 370 нм. Таким образом, наибольшее просветляющее действие на склеру кролика на длине волны 370 нм по сравнению с другими рассмотренными просветляющими агентами оказал 85% раствор глицерина.

Как показали измерения, иммерсионное просветление в 85% растворе глицерина позволяет значительно увеличить прозрачность и свиной склеры (рисунке 2.4). Выдерживание в

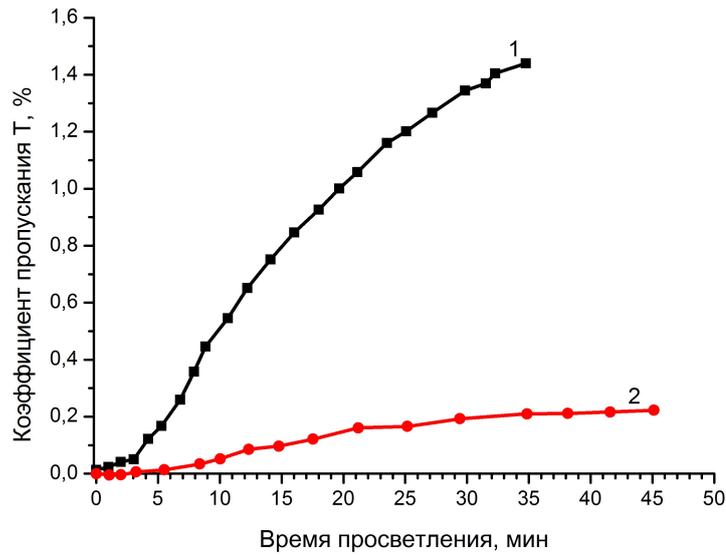


Рисунок 2.3. Изменение коэффициента коллимированного пропускания на длине волны 370 нм образцов склеры кролика при их просветлении в водных растворах глюкозы различной концентрации (1– 54%, 2 – 40%).

этой иммерсионной жидкости образца склеры свињи в течение 55 минут увеличило коллимированное пропускание образца на длине волны 370 нм до 14,2%. Учитывая высокую эффективность этого иммерсионного агента, в дальнейших исследованиях, описанных в данной главе, использовался именно он.

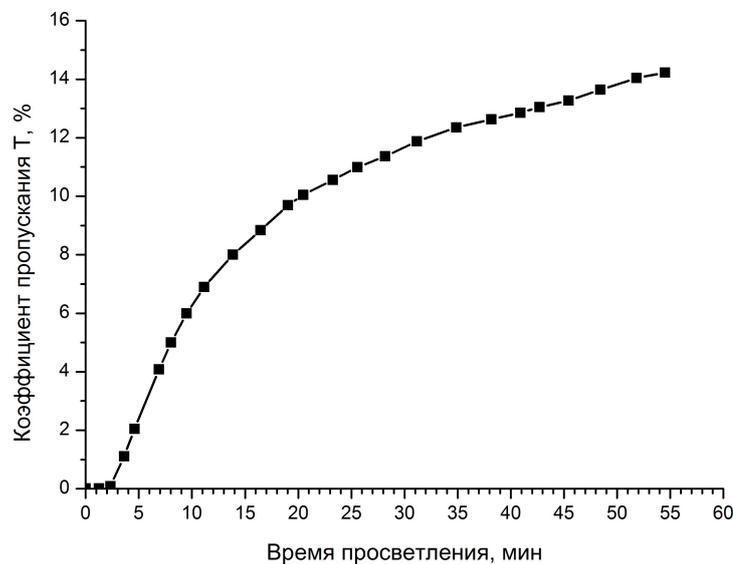


Рисунок 2.4. Изменение коэффициента коллимированного пропускания на длине волны 370 нм образца склеры свињи при просветлении в 85% растворе глицерина.

2.2 Влияние оптического просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания склеры

Оценка биомеханического эффекта рибофлавин/УФ кросслинкинга также проводилась на образцах склеры свиньи и кролика. Склера, очищенная от сетчатки и эписклерального слоя, разрезалась в сагиттальном направлении на полосы шириной 4 мм. После препарирования образцы хранились в физиологическом растворе.

Механические свойства измерялись с помощью динамического механического анализатора DMA Q800. В данном приборе образец склеры, располагался вертикально между неподвижным и подвижным зажимами. Регистрировалось либо изменение длины образца при заданной скорости изменения приложенной силы, либо изменение силы, необходимое для растяжения образца с заданной скоростью удлинения. По результатам измерений, учитывая изменение поперечного сечения образца в предположении постоянства объема, вычислялись механическое напряжение в образце и его относительное удлинение. Механическое напряжение σ рассчитывалось по формуле

$$\sigma = \frac{F(l_0 + \Delta l)}{S_0 l_0}, \quad (2.1)$$

где F – сила, прикладываемая к образцу, l_0 – начальная длина образца, Δl – изменение длины образца, S_0 – начальная площадь поперечного сечения образца.

Относительное удлинение образца ε рассчитывалось согласно определению этой величины по формулам

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \text{ (в долях)}, \quad \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \cdot 100\% \text{ (в процентах)}. \quad (2.2)$$

Для оценки и сравнения жесткости образцов склеры определялось значение модуля Юнга ткани E при относительном удлинении 18%:

$$E_{0,18} = \left. \frac{d\sigma}{d\varepsilon} \right|_{\varepsilon=0,18}. \quad (2.3)$$

2.2.1 Влияние иммерсионного агента на механические свойства склеры

На первом этапе биомеханических исследований было оценено, насколько обратимыми являются изменения механических свойств ткани, вызванные воздействием иммерсионного

агента, то есть восстанавливаются ли механические свойства ткани после вымывания иммерсионного агента и регидратации образца. Было проведено сравнение механических свойств образца склеры свиной в нативном состоянии (1), этого же образца, просветленного в 85% растворе глицерина в течение 1 часа (2), и этого же образца, выдержанного в физиологическом растворе в течение суток после оптического просветления для вымывания иммерсионного агента и регидратации образца (3). При механических измерениях образцы растягивали, линейно увеличивая нагрузку со скоростью 1 Н/мин, в течение 5 минут. Полученные зависимости "механическое напряжение–относительное удлинение" представлены на рисунке 2.5.

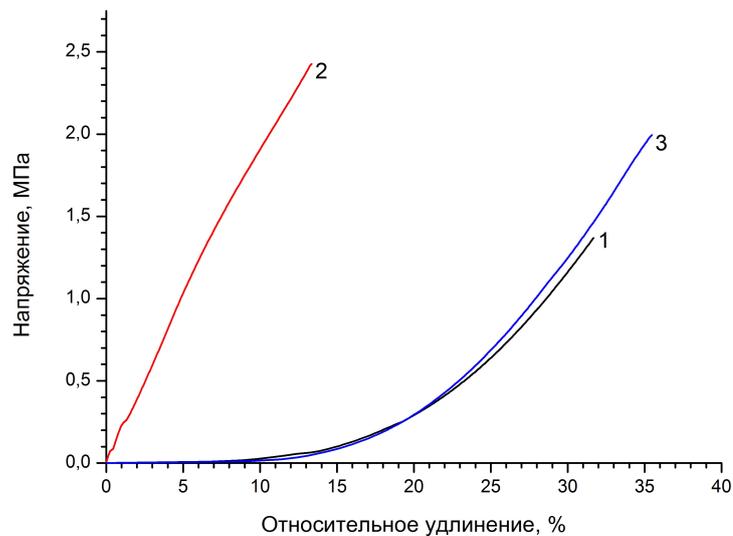


Рисунок 2.5. Зависимости механического напряжения от относительного удлинения для образца свиной склеры в нативном состоянии (1), после его иммерсионного просветления в 85% растворе глицерина в течение 1 часа (2), и после последующего выдерживания в физиологическом растворе в течение 1 суток (3).

Значительное удлинение нативного образца склеры (кривая 1) при малой приложенной силе может быть в большей степени обусловлено переориентацией коллагеновых пучков и "расправлением" их волнистой структуры. Из рисунка 2.5 видно, что зависимость $\sigma(\varepsilon)$, полученная сразу после иммерсионного просветления образца (кривая 2), не имеет такого пологого начального участка. Значение модуля Юнга при относительном удлинении 18% для просветленного образца составило 18,8 МПа, в то время как значение модуля Юнга при таком же относительном удлинении для нативного образца составило всего 4,2 МПа. Значительное увеличение жесткости склеры при просветлении в 85% растворе глицерина по всей видимости связано с дегидратацией ткани и замещением воды глицерином в интерстициальной жидкости стромы, что препятствуют скольжению коллагеновых волокон друг относительно друга при растяжении склеры.

Кривая 3, характеризующая механические свойства регидратированного образца хорошо совпадает с кривой нативного образца (кривая 1). Для регидратированного в физиологическом растворе образца склеры значение модуля Юнга при относительно удлинении 18% составило 4,6 МПа. Это дает основание утверждать, что само по себе иммерсионное просветление в растворе глицерина последующей регидратацией не приводит к изменению механической жесткости склеры.

2.2.2 Изменение механических свойств склеры после рибофлавин/УФ фотосшивания с предварительным оптическим просветлением ткани

Для изучения влияния оптического просветления на эффективность методики фотосшивания проводилось сравнение механических свойств образцов склеры, подвергнутых рибофлавин/УФ фотосшиванию с оптическим просветлением и без него. Следуя методике, описанной в работах [1–4], образцы склеры помещались в 0,1% раствор рибофлавина в физиологическом растворе, но для достижения большей концентрации рибофлавина в ткани время выдерживания было увеличено до 1 часа. После одну группу образцов сразу подвергали облучению, другую предварительно выдерживали в 85% растворе глицерина, содержащем 0,1% рибофлавина, в течение 1 часа. Облучение образцов проводилось в течение 30 минут с помощью ксеноновой лампы с фильтром УФС6, выделяющим ультрафиолетовую область спектра. Плотность УФ излучения, падающего на образец, составляла 14,01 мВт/см². Затем обе группы образцов помещали в физиологический раствор. Просветленные образцы после фотосшивания выдерживались в физиологическом растворе для вымывания глицерина и регидратации.

Первая серия экспериментов проводилась на образцах склеры свиньи. Как и в экспериментах, описанных в предыдущем разделе, при измерении механических свойств образцы (полоски склеры) растягивались при увеличении силы, прикладываемой к образцу, с постоянной скоростью 1 Н/мин в течение 5 минут. Полученные зависимости "механическое напряжение – относительное удлинение" для образцов, подвергнутых рибофлавин/УФ фотосшиванию с оптическим просветлением и без него, представлены на рисунке 2.6. На этом же рисунке для сравнения приведены данные для нативного образца.

Найденные по представленным кривым значения модуля Юнга при относительном удлинении 18% составили 8,3 МПа для образца, обработанного по обычной методике рибофлавин/УФ фотосшивания, 21,9 МПа для образца склеры, обработанного по методике рибофла-

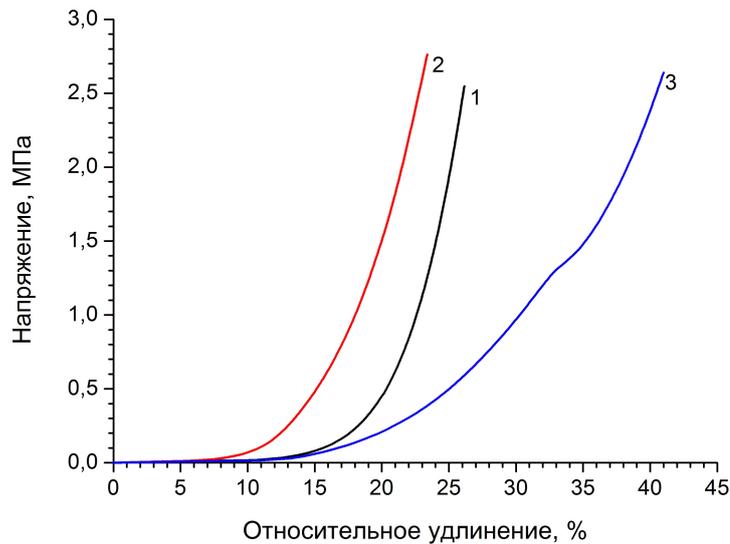


Рисунок 2.6. Зависимости механического напряжения от относительного удлинения для образцов свиной склеры. 1 – образец подвергнут рибофлавин/УФ фотосшиванию без оптического просветления, 2 – образец подвергнут рибофлавин/УФ фотосшиванию с оптическим просветлением, 3 – образец в нативном состоянии.

вин/УФ фотосшивания с оптическим просветлением, а затем регидратированного, и 3,4 МПа для контрольного образца в нативном состоянии.

Из результатов данного эксперимента видна тенденция к большему увеличению жесткости склеры после рибофлавин/УФ фотосшивания с предварительным оптическим просветлением по сравнению с обычным методом фотосшивания. Однако, полученные численные оценки не кажутся достаточно надежными из-за плохой воспроизводимости результатов измерений, получаемых при однократном растяжении образца, от образца к образцу, что отмечалось в литературе [4] и наблюдалось в наших экспериментах. Было замечено, что при первом растяжении склеры механические свойства (кривые "механическое напряжение – относительное удлинение") могли сильно различаться для образцов, подвергавшихся одинаковой обработке. Такое различие механических свойств при однократном растяжении можно объяснить различной организацией коллагеновой структуры в исследуемых образцах. Но при многократном растяжении склеры (начиная с 5 цикла растяжения) зависимости "напряжение – относительное удлинение" для разных образцов одного типа становились схожими. Поэтому было решено в последующих экспериментах проводить сравнение механических свойств образцов после 5 циклов растяжения (аналогичный способ измерения был использован в [4]). Для повышения вероятности того, что сравниваемые образцы будут обладать похожими морфологическими свойствами, при оценке влияния иммерсионного просветления

на эффективность фотосшивания проводилось попарное сравнение механических свойств образцов, вырезанных из одной и той же области склеры.

Вторая серия экспериментов проводилась с образцами склеры кролика. В этой серии образцы подвергались нескольким циклам растяжения. На каждом цикле расстояние между зажимами образца сначала увеличивалось (образец растягивался) с постоянной скоростью 1500 мкм/мин в течение 40 с, затем в течение такого же времени с такой же скоростью уменьшалось. Полученные зависимости "механическое напряжение – относительное удлинение" образцов в нативном состоянии, а также, подвергнутых фотосшиванию с просветлением и без него, представлены на рисунке А.2 в приложении А.

Сначала были проведены оценки изменения жесткости склеры после обычной процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания. Рассчитывалось отношение значений напряжения при 8% относительном удлинении после 5 растяжений для образца, подвергнутого рибофлавин/УФ фотосшиванию, и для его парного необработанного образца (рисунок 2.7). В идеальных условиях это отношение должно равняться 1, если фотосшивание не изменяет жесткости ткани, и быть больше 1 при увеличении жесткости ткани в результате фотосшивания. Среднее значение такого отношения, показанное на рисунке 2.7 красной линией, для исследуемых 8 пар образцов составило $1,43 \pm 0,36$ ($P = 0,9$), что свидетельствует о том, что рибофлавин/УФ кросслинкинг приводит к увеличению жесткости ткани.

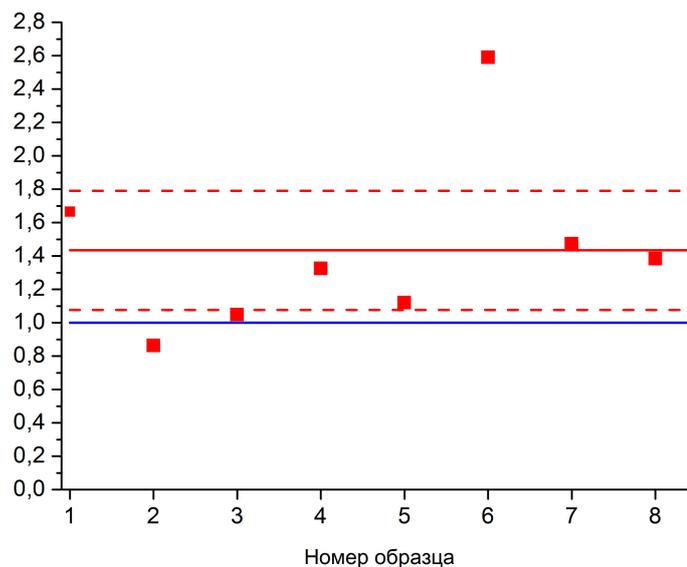


Рисунок 2.7. Отношение значений напряжения при 8% относительном удлинении при пятом растяжении склеры кролика для образцов, подвергнутых рибофлавин/УФ фотосшиванию, и для необработанных образцов. Пунктирными линиями указан 90% доверительный интервал для среднего значения.

Затем проводилось попарное сравнение механических свойств образцов склеры, подвергнутых рибофлавин/УФ фотосшиванию с предварительным оптическим просветлением, и образцов склеры, подвергнутых фотосшиванию без просветления (рисунок 2.8). Значения напряжения, соответствующего 8% относительному удлинению, для образцов, фотосшитых с просветлением, оказались в среднем в $1,33 \pm 0,32$ ($P = 0,7$; 3 пары образцов) больше, чем для образцов, фотосшитых без просветления, что позволяет утверждать, что рибофлавин/УФ фотосшивание склеры в просветленном состоянии с вероятностью 0,7 (при условии нормального распределения среднего) приводит к большему увеличению жесткости по сравнению с обычным рибофлавин/УФ фотосшиванием.

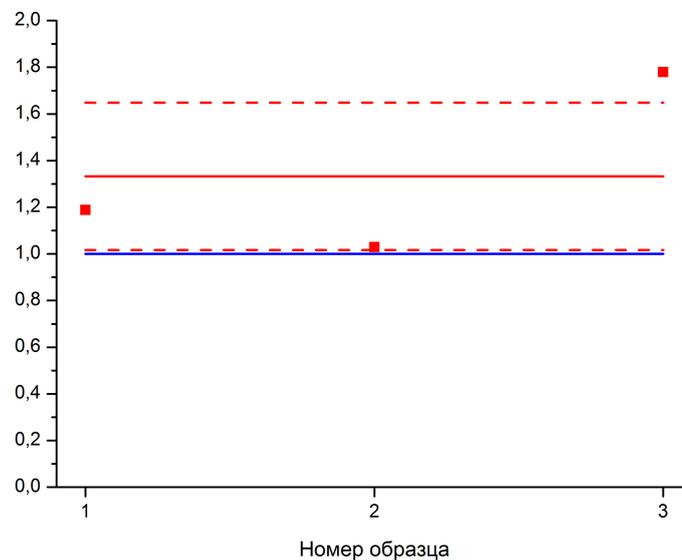


Рисунок 2.8. Отношение значений напряжения при 8% относительном удлинении при пятом растяжении склеры кролика для образцов, подвергнутых рибофлавин/УФ фотосшиванию с предварительным оптическим просветлением, и образцов склеры, подвергнутых фотосшиванию без просветления. Пунктирными линиями указан 70% доверительный интервал для среднего значения.

2.3 Заключение к главе 2

Полученные в этой главе результаты нужно рассматривать как качественные и оценочные. Однако даже в рамках обсуждения этих первых результатов можно говорить о том, что иммерсионное оптическое просветление в идентичных условиях обработки образца склеры рибофлавином и последующего УФ облучения приводит к большему увеличению жесткости склеры при малой относительной деформации.

Оценка экспериментальных данных, полученных в ходе предварительных исследований влияния иммерсионного просветления на эффективность фотосшивания, показала, что для адекватной оценки влияния просветления необходима более полная информация об образцах и процессах, протекающих в них при просветлении и регидратации. Во-первых, это касается морфологии образцов. Известно, что механические свойства таких тканей как склера и дерма являются анизотропными – они зависят от направления приложения силы (ткань растягивается по-разному в разных направлениях). Это связано с наличием направлений преимущественной ориентации коллагеновых волокон на участках макроскопических размеров. Известно, что склере характерна значительная вариация направления преимущественной ориентации коллагеновых волокон и степени их ориентационной упорядоченности. Оценка эффективности применения иммерсионного просветления при фотосшивании с помощью механических измерений строится на сравнении свойств разных образцов ткани, обработанных в соответствии с разными протоколами. Для того чтобы это сравнение было информативным, необходимо, чтобы сравниваемые образцы имели схожие морфологические свойства. Поэтому необходимо заранее знать организацию коллагеновой структуры в исследуемых образцах и уметь выбирать области с близкими морфологическими свойствами. Как уже отмечалось, литературные данные о макроструктурной организации коллагеновой сети в склере очень ограничены. Для характеристики организации тканей, таких как склера, на макроуровне используются карты ориентации коллагеновых волокон, показывающие преимущественное направление и степень их ориентации в разных областях. В настоящее время такого рода карты, получаемые с помощью метода малоуглового рассеяния света [12, 13], метода рассеяния рентгеновских лучей [14–16], нелинейной микроскопии [12, 17] и поляризационной микроскопии [18, 19], начинают использоваться как при изучении биомеханики тканей глаза, так и при изучении глазных болезней [16]. В настоящей работе исследовалась возможность применения для картирования коллагенового матрикса методов поляризационной микроскопии (см. приложение Б). Эти методы являются наиболее простыми и доступными. Кроме того, они обеспечивают наибольшую площадь захвата данных и, как было установлено при выполнении настоящей работы, в определенных условиях применимы для характеристики образцов большой толщины (до 2 мм) без необходимости их секционирования.

Вторым фактором, подлежащим учету при проведении биомеханических исследований, является степень гидратации ткани [11]. Известно, что степень гидратации коллагенсодержащих тканей сильно влияет на механические свойства тканей. Поэтому, по меньшей мере, желательно осуществлять мониторинг содержания воды в ткани при проведении экспериментов. В ходе выполнения настоящей работы была разработана оригинальная методика

оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии (раздел 4.2 главы 4). Была экспериментально получена калибровочная кривая, позволяющая оценивать содержание воды по измеренному значению группового показателя преломления ткани. В третьих, необходимо знать, как изменяется состав жидкостей в ткани в процессе ее иммерсионного просветления и при вымывании иммерсионного агента из ткани. В рамках данной работы была разработана эффективная ОКТ-методика, позволяющая оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации (раздел 4.3 главы 4).

Глава 3

Оценка влияния оптического просветления на протекание рибофлавин/УФ кросслинкинга в склере с помощью двухфотонной микроскопии

В данной главе представляются результаты исследований возможностей применения для мониторинга изменений, происходящих в ткани на разных стадиях процесса фотосшивания, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники (backward second harmonic generation, BSHG) и двухфотонной флуоресценции (two photon fluorescence, TPF) с временным разрешением (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM). Основным достоинством нелинейной микроскопии является возможность проведения измерений *in vivo*. Как будет показано в разделе 3.3, FLIM-микроскопия является очень информативной в плане оценки интенсивности протекания фотохимических реакций при фотосшивании склеры. Экспериментальные данные, представленные в разделе 3.3, позволяют утверждать, что иммерсионное оптическое просветление действительно способно значительно увеличить интенсивность протекания процесса фотосшивания склеры. Результаты исследований опубликованы в работе [176].

Измерения проводились в национальном исследовательском Томском государственном университете.

3.1 Материалы и методы

Эксперименты проводились на препарированной склере свиньи. Перед экспериментами склера тщательно очищалась от сетчатки и разрезалась в сагиттальном направлении на полоски размером $0,5 \times 1,3$ см². Эксперименты проводились на тканевых блоках, взятых с экваториальной области глазного яблока. До измерений и между измерениями образцы хранились в физиологическом растворе (0,9% водный раствор NaCl) при температуре 4°C.

Для характеристики образцов использовался мультифотонный томограф JenLab MPTflex (Германия) с перестраиваемым титан-сапфировым фемтосекундным лазером ближнего ИК диапазона. В рассматриваемых экспериментах образцы освещались излучением с длительностью импульса 200 фс и частотой следования импульсов 80 МГц. Центральная длина волны излучения лазера составляла 760 нм, мощность излучения – 50 мВт. Числовая апертура объектива NA=1,3 обеспечивала пространственное разрешение 0,5 мкм в латеральном и 2 мкм в аксиальном направлении. Томограф регистрирует сигналы флуоресценции образца, возбуждаемой за счет двухфотонного поглощения (TPF), при помощи ФЭУ, позволяя проводить измерения времени жизни флуоресценции образцов и использовать технику FLIM. Также прибор регистрирует сигналы генерации второй гармоники (BSHG). Регистрируемый сигнал флуоресценции является интегральным по спектральному диапазону 409–680 нм, сигнал BSHG – интегральным по диапазону 373–387 нм. На рисунке 3.1 представлены фотография экспериментальной установки и изображение программы обработки функций затухания флуоресценции, а также примеры получаемых TPF и SHG изображений.

При проведении экспериментов образец склеры прикреплялся внешней стороной к покровному стеклу. Перед размещением образца на покровное стекло наносилось несколько капель физиологического раствора, чтобы обеспечить оптический контакт. Для каждого образца склеры регистрировались TPF и SHG изображения, а также функции затухания флуоресценции (ФЗФ) на разных глубинах. Измерения проводились для глубин ~8, 17, 25, 34, 42, 51, 59, 68 и 76 мкм. Локальные функции затухания флуоресценции (ФЗФ) рассчитывались с помощью программы обработки данных SPCImage 6.4 усреднением по квазиоднородным областям площадью $4,6 \times 4,6$ мкм² (7×7 пкс²), выделяемым по TPF и BSHG изображениям.

В качестве иммерсионного просветляющего агента использовался 88% водный раствор глицерина. Время выдерживания образцов в иммерсионном агенте было подобрано на основе данных ОКТ-мониторинга изменений оптических и геометрических характеристик образцов склеры, происходящих в процессе оптического просветления. Геометрические размеры и прозрачность образцов свиной склеры оценивались по изображениям поперечного сечения

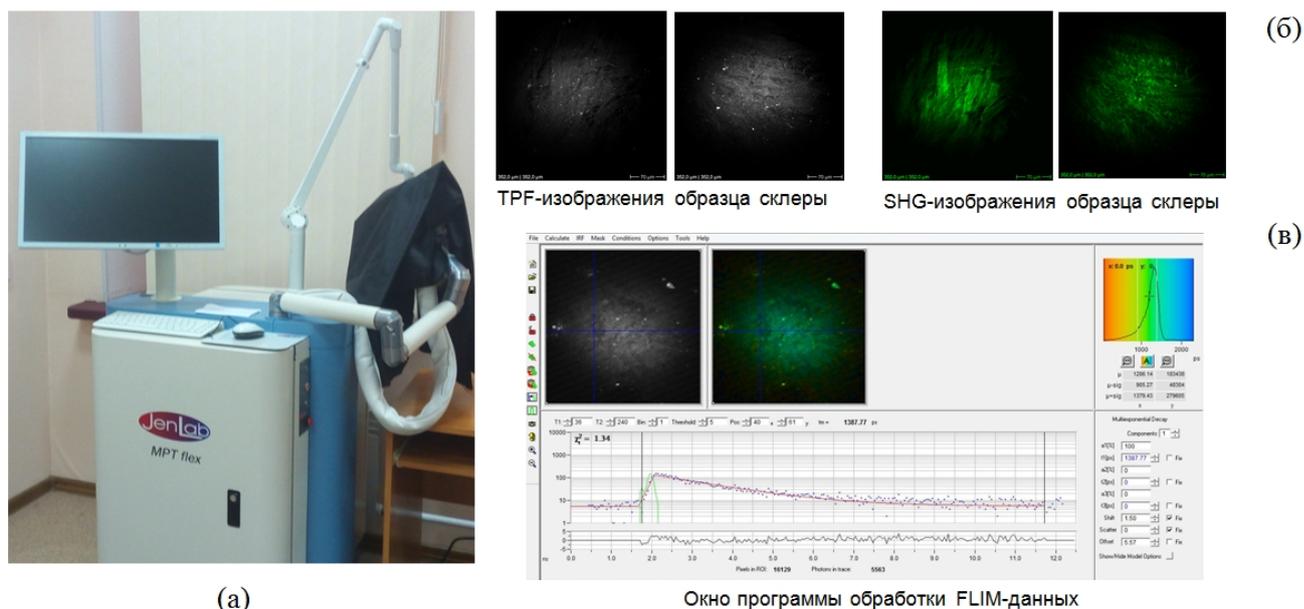


Рисунок 3.1. (а) Мультифотонный томограф JenLab MPTflex, (б) TPF и SHG изображения образца склеры, (в) изображение программного обеспечения обработки функций затухания флуоресценции.

образцов, полученным с помощью оптического когерентного томографа (ОКТ) ThorLabs GANYMEDE-II. ОКТ-изображения образца размером $0,5 \times 1,5 \text{ см}^2$, находившегося на предметном стекле с бортиками, регистрировались в течение часа после добавления иммерсионной жидкости. Обработка изображений проводилась с помощью свободно распространяемой компьютерной программы Icy [177]. На рисунке 3.2 представлены данные по изменению площади поперечного сечения образцов после добавления раствора глицерина. Значение площади в каждый момент времени было нормировано на значение площади образца в первый момент регистрации процесса просветления (1-1,5 минуты после погружения образца в иммерсионный агент). Представленные данные показывают, что в течение первых 20 минут после добавления глицерина происходит уменьшение площади ткани, что говорит о преобладании процесса выхода воды из образца (дегидратации). После этого наблюдается увеличение площади образца за счет диффузии иммерсионного агента в ткань. За первые 20 минут просветления прозрачность ткани становилась достаточно высокой и далее не улучшалась. Поэтому в дальнейших экспериментах для оптического просветления склеры образцы выдерживались в растворе глицерина в течение 20 минут.

В соответствии с методикой фотосшивания, описанной в работах [1–4], нативные образцы склеры помещались в 0,1% раствор рибофлавина на 20 минут. Часть образцов выдерживали в 88% растворе глицерина 20 минут для оптического просветления ткани. Затем образцы облучали в течение 30 минут ультрафиолетовым излучением с помощью УФ-светодиода с

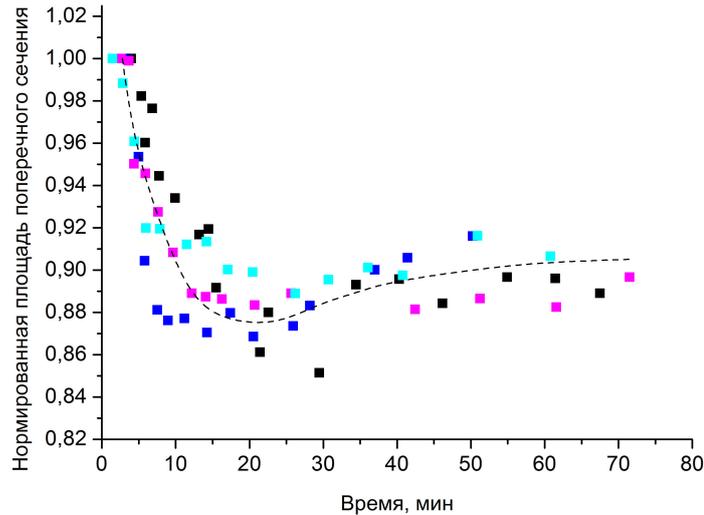


Рисунок 3.2. Изменение нормированной площади поперечного сечения образцов склеры при оптическом просветлении в 88 % растворе глицерина.

максимумом излучения на длине волны 370 нм; освещенность образца составляла 3 мВт/см². После облучения образцы выдерживались в физиологическом растворе в течение 1 суток.

3.2 Интенсивность SHG изображений склеры после рибофлавин/УФ кросслинкинга

Анализ SHG изображений был проведен для образцов свиной склеры в нативном состоянии и после их фотосшивания в обычном или просветленном состоянии. Для каждого образца, как в нативном состоянии, так и после рибофлавин/УФ фотосшивания, были получены TRF и BSHG изображения для различных глубин. В качестве примера на рисунке 3.3 представлены TRF и BSHG изображения образца склеры в нативном состоянии на глубинах 17, 34, 59 и 68 мкм. Рисунок 3.4 представляет данные для того же образца после фотосшивания, которое проводилось без оптического просветления. На рисунке 3.5 показаны TRF и BSHG изображения другого образца после его фотосшивания в просветленном состоянии. Представленные данные для обоих случаев были сняты через сутки после фотосшивания.

Обработка данных показала, что средняя интенсивность BSHG изображений относительно глубоко залегающих слоев (с глубиной залегания 68 мкм и больше) образцов склеры после их фотосшивания без иммерсионного просветления остается приблизительно такой же, как в нативном состоянии, а после фотосшивания в просветленном состоянии становится несколько

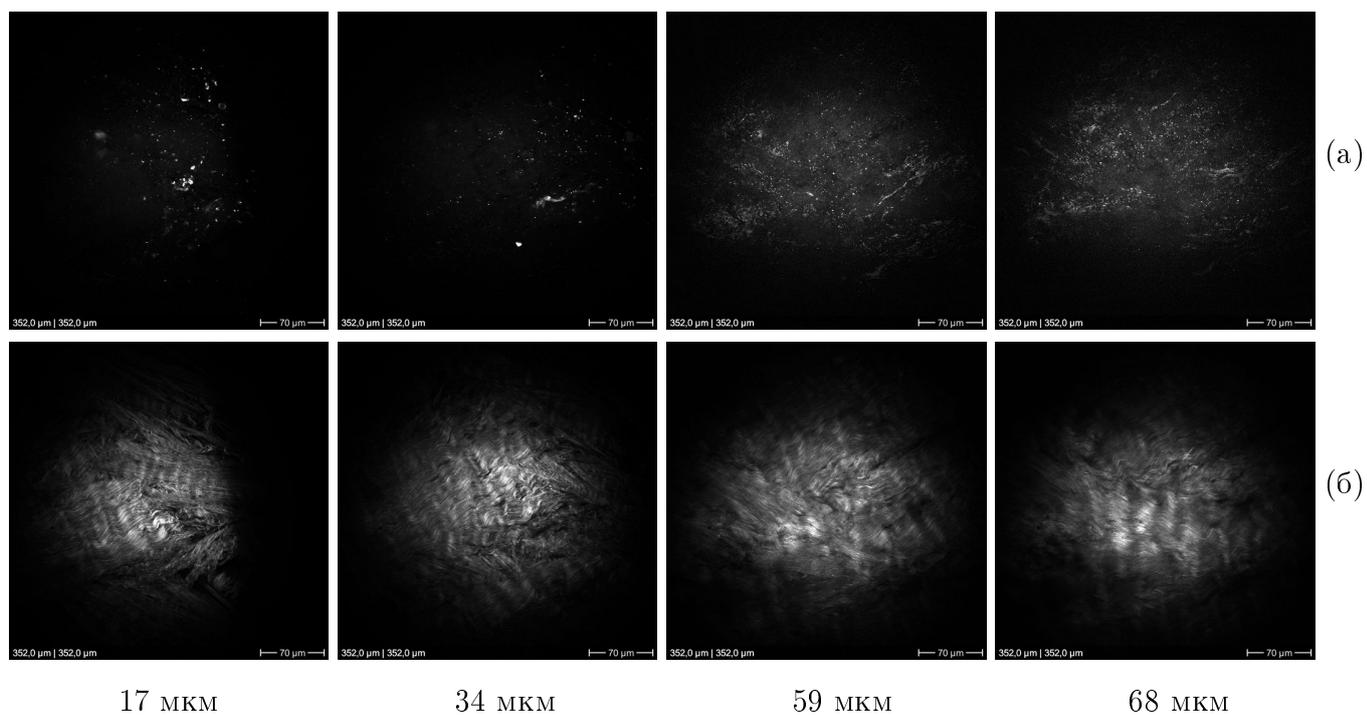


Рисунок 3.3. TPF (а) и BSHG (б) изображения образца склеры в нативном состоянии на разной глубине.

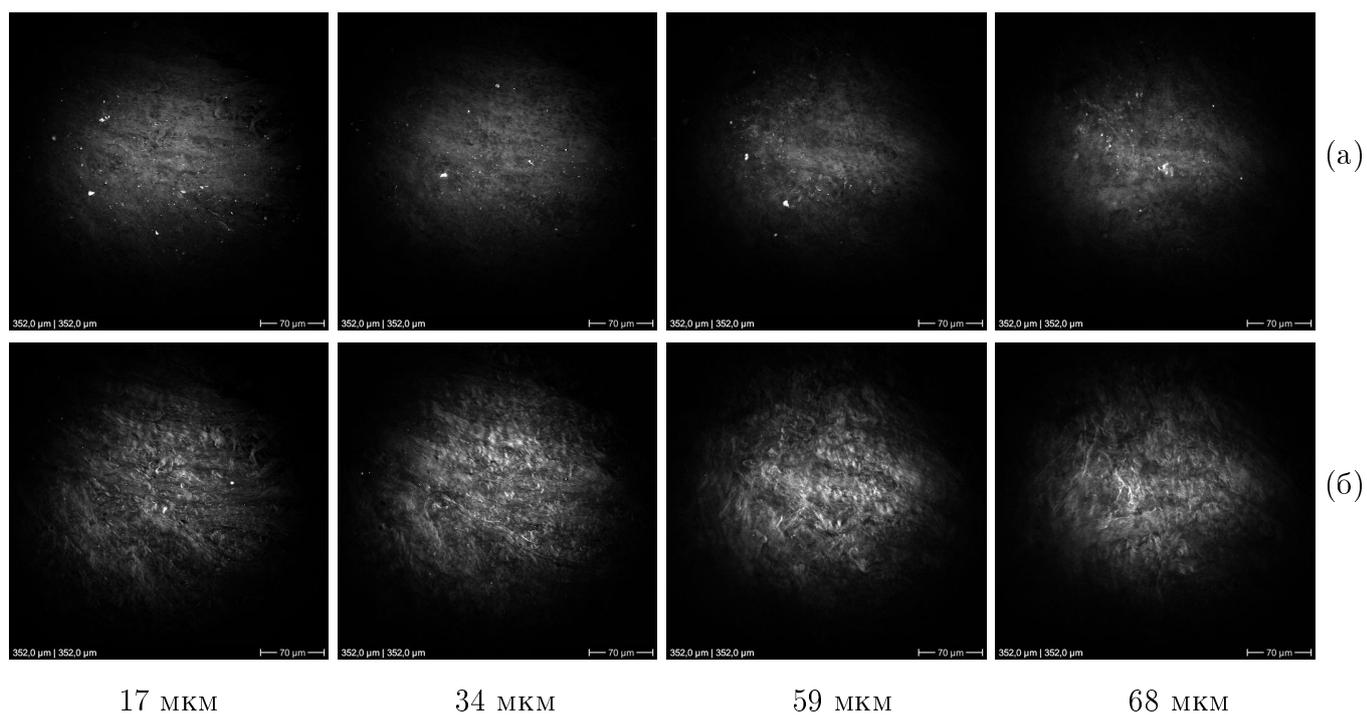


Рисунок 3.4. TPF (а) и BSHG (б) изображения образца склеры после фотосшивания без оптического просветления на разной глубине.

выше по сравнению с нативным состоянием. Так, отношение средних интенсивностей BSHG изображений на глубине 68 мкм, полученных после фотосшивания и в нативном состоянии, составило $0,984 \pm 0,159$ ($\pm SD$) для образцов, фотосшитых без оптического просветления, и $1,064 \pm 0,125$ для образцов, фотосшитых с просветлением (усреднение проводилось по 13

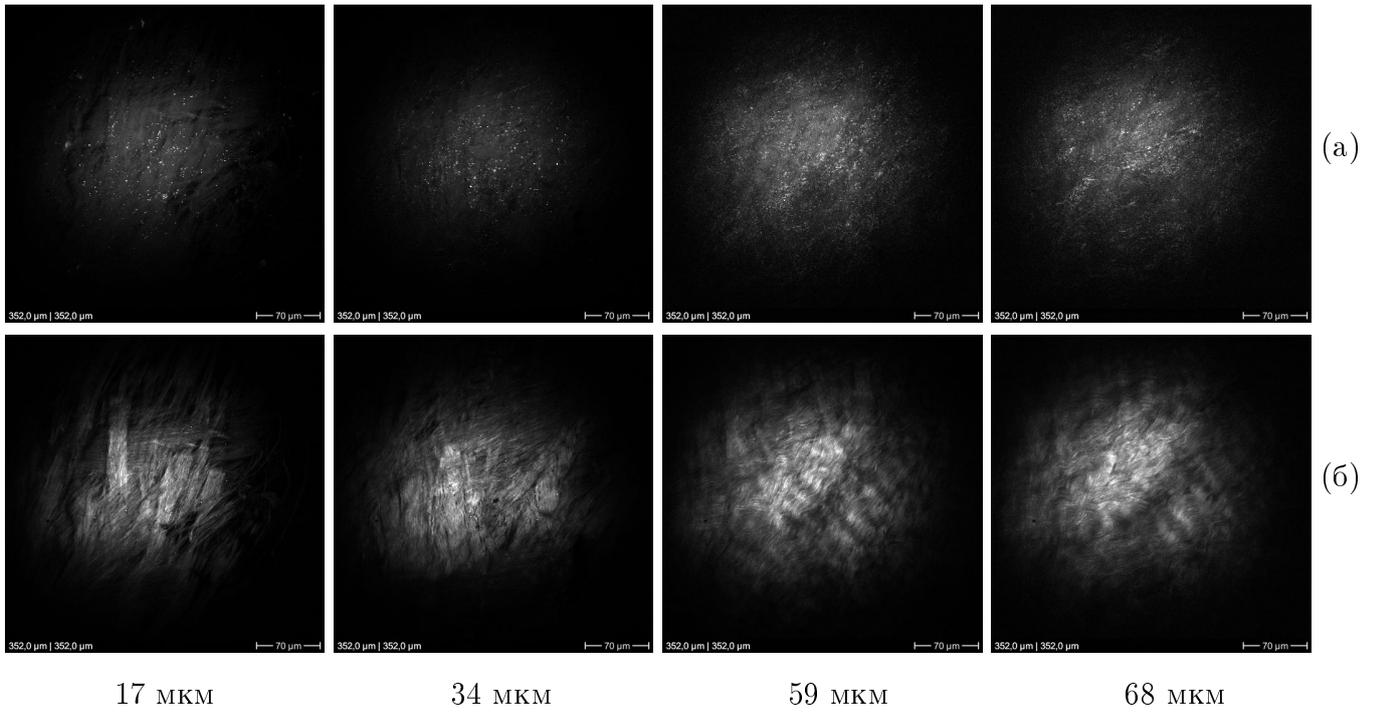


Рисунок 3.5. TPF (а) и BSHG (б) изображения образца склеры после фотосшивания в просветленном состоянии.

участкам 5 образцов склеры в нативном состоянии, 10 участкам 3 образцов склеры, фотосшитых без оптического просветления, и 14 участкам 3 образцов, фотосшитых с оптическим просветлением). Эти результаты согласуются с результатами, полученными для склеры в работе [75] и для роговицы [178]. Однако зарегистрированное в нашем эксперименте увеличение среднего сигнала BSHG было очень малым на фоне вариаций данных от участка к участку и от образца к образцу. Анализ данных с помощью t -критерия Стьюдента (t) показал, что различие полученных средних значений интенсивности BSHG сигнала образцов в нативном состоянии ($69,170 \pm 8,372$ отн. ед.) и образцов, фотосшитых без оптического просветления ($68,053 \pm 11,018$ отн. ед.), не может считаться статистически значимым ($t = 0,277$ при $p = 0,785$). Подобный анализ также показал отсутствие статистически значимого различия ($t = 1,359$ при $p = 0,186$) между средними значениями интенсивности BSHG сигнала образцов в нативном состоянии и после фотосшивания с оптическим просветлением ($73,620 \pm 8,619$ отн. ед.).

3.3 Анализ влияния оптического просветления на протекание рибофлавин/УФ кросслинкинга в склере на основе данных FLIM

При фотосшивании образцов без просветления FLIM-измерения производились на следующих стадиях: 1) после выдерживания образца в растворе рибофлавина, 2) сразу после УФ-обработки, 3) после длительного выдерживания (1 сутки) образцов в физиологическом растворе (для вымывания рибофлавина и продуктов фотолиза из образца). При фотосшивании образцов с просветлением FLIM-измерения осуществлялись 1) после выдерживания образца в растворе рибофлавина, 2) после выдерживания в растворе глицерина (оптическое просветление), 3) сразу после УФ-обработки, 4) после выдерживания образцов в физиологическом растворе одни сутки. На первой стадии (после выдерживания образца в растворе рибофлавина) флуоресценция образцов определяется главным образом флуоресценцией эндогенных флуорофоров и рибофлавина. В ходе оптического просветления из ткани выходит некоторое количество воды, а небольшое количество глицерина проникает в ткань. Поскольку глицерин практически не поглощает на длине волны 380 нм, вкладом флуоресценции глицерина в регистрируемую флуоресценцию образца можно пренебречь. В ходе УФ-обработки при интенсивном течении фотохимических реакций, связанных с фотосшиванием, вклад флуоресценции рибофлавина в суммарную флуоресценцию должен существенно уменьшаться. Хорошо известно, что под действием ультрафиолетового излучения растворы рибофлавина могут частично обесцвечиваться за счет превращения некоторой части рибофлавина в лейкофлавин (полностью восстановленный рибофлавин, 1,5-дигидрорибофлавин, RfH_2 на рис. 1.7 и в уравнениях (1.6) и (1.8)). Лейкофлавин является бесцветным, имеет значительно меньший коэффициент экстинкции на длине волны 380 нм, чем рибофлавин [165, 179], и не флуоресцирует [180, 181]. Последнее обуславливает тот факт, что частичное превращение рибофлавина в лейкофлавин приводит к уменьшению флуоресценции раствора, и это уменьшение тем больше, чем больше рибофлавина превратилось в лейкофлавин и чем большей является текущая концентрация лейкофлавина в растворе – лейкофлавин, взаимодействуя с молекулярным кислородом, может превращаться во флуоресцирующие вещества, такие как формилметилфлавин, люмифлавин, люмихром [87, 142, 179–181], а также обратно в рибофлавин [87]. Формилметилфлавин и люмифлавин имеют аналогичные рибофлавину свойства поглощения и флуоресценции [163, 182–185]. Люмихром при рассматриваемых условиях

возбуждении в отличие от рибофлавина максимально флуоресцирует не в зеленой, а в синей области спектра [181, 182, 184, 186, 187]. Кинетика трансформации рибофлавина в растворах при УФ-облучении (как ход реакций, так и временные зависимости текущих концентраций рибофлавина и его производных) сильно зависит от множества факторов, в частности, pH среды и доступности молекулярного кислорода [163, 181–184, 186–192]. Эксперименты по фотосшиванию роговицы показывают, что при стандартных концентрации используемого раствора рибофлавина и интенсивности УФ-облучения интенсивность флуоресценции в области 500–600 нм пропитанной рибофлавином ткани в процессе УФ-обработки существенно уменьшается [140, 151, 193]. Также значительно уменьшается и поглощение ткани в ближней УФ-области [153]. Так, в эксперименте, описанном в работе [153], на стадиях непосредственно после пропитывания роговицы человека рибофлавином и через 5 и 30 мин от начала УФ-обработки измеренные значения коэффициента пропускания роговицы на длине волны 370 нм составили соответственно 24%, 75% и 94% относительно его исходного значения (до пропитывания рибофлавином). Такие изменения коэффициента пропускания ткани указывают на резкое увеличение концентрации лейкофлавина в экспонируемой области за счет превращения рибофлавина → лейкофлавин и несущественный вклад в оптические свойства ткани на временном интервале 5–30 мин от начала УФ-обработки других производных рибофлавина из-за их малой концентрации (на длине волны 380 нм формилметилфлавин, люмифлавин и люмихром имеют коэффициенты экстинкции, сравнимые с коэффициентом экстинкции рибофлавина). Это дает основания полагать, что в качестве одного из признаков интенсивного хода фотохимических реакций, сопровождающих фотосшивание, может рассматриваться значительное уменьшение интенсивности флуоресценции экзогенных флуорофоров в ткани в процессе ее УФ-обработки. В наших экспериментах мы оценивали флуоресценцию экзогенных флуорофоров по величине ее относительного вклада в суммарную флуоресценцию эндогенных и экзогенных флуорофоров. Достаточно точно выделить флуоресценцию экзогенных флуорофоров из общего сигнала в рассматриваемом эксперименте позволяет то обстоятельство, что характерное время затухания флуоресценции рибофлавина (основного экзогенного флуорофора в нашем случае) является существенно большим, чем время затухания флуоресценции эндогенных флуорофоров в склере (см. раздел 3.3.1). Для выделения вклада экзогенных флуорофоров мы использовали метод декомпозиции кривой затухания по эмпирическим базисным функциям, которые были получены по данным FLIM для нативных образцов склеры и раствора рибофлавина (раздел 3.3.1). Данный подход позволяет практически исключить влияние на конечные результаты поглощения и рассеяния света в ткани.

3.3.1 Результаты исследования флуоресценции эндогенных флуорофоров в склере и флуоресценции рибофлавина. Декомпозиция функций затухания флуоресценции

На рисунке 3.6 в качестве примера представлены функции затухания флуоресценции для разных участков одного из образцов склеры в нативном состоянии для различных глубин. Как видно из этого рисунка, ФЗФ для различных глубин существенно различаются по высоте пиков. Это различие связано не только с неоднородностью ткани по содержанию флуорофоров, но, в большей степени, с рассеянием света в среде (интенсивность возбуждающего излучения является разным для разных глубин, как и степень уменьшения сигнала флуоресценции за счет рассеяния) и условиями фокусировки. Для областей зондирования с глубиной залегания больше 20 мкм наблюдается общая тенденция к снижению регистрируемой интенсивности флуоресценции с увеличением глубины зондирования. Как показали измерения, для образцов склеры в нативном состоянии хорошая информативность FLIM-сигнала сохраняется до глубин порядка 80 мкм. Форма кривой затухания флуоресценции главным образом определяется составом флуорофоров и их молекулярным окружением в пределах объема, с которого снимается сигнал флуоресценции, и, в отличие от регистрируемой интенсивности флуоресценции, почти не зависит от оптических свойства слоев ткани, расположенных выше зондируемой области. Поэтому в нашем случае оценки производились, главным образом, посредством анализа формы ФЗФ.

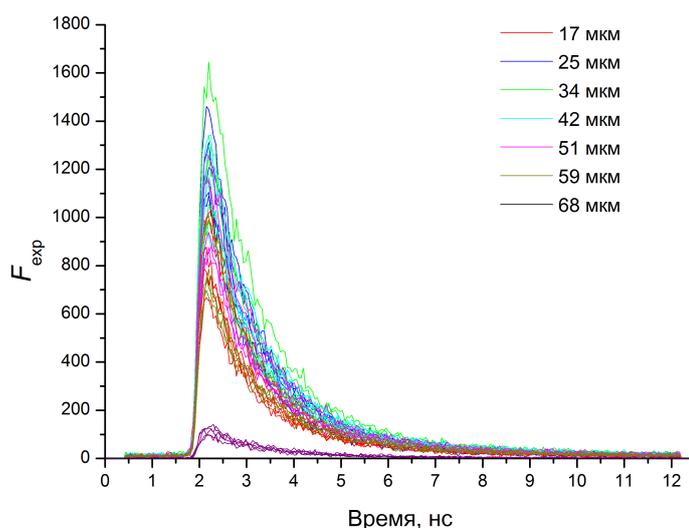


Рисунок 3.6. Функции затухания флуоресценции (F_{exp}) на разных участках одного образца склеры в нативном состоянии для различных глубин.

Для оценки степени и характера изменений формы локальных ФЗФ каждая экспериментальная функция затухания флуоресценции $F_{\text{exp}}(t)$ представлялась в виде

$$F_{\text{exp}}(t) = I_{\text{avr}} f_{\text{exp}}(t), \quad (3.1)$$

где I_{avr} – средняя регистрируемая интенсивность флуоресценции за период времени T между импульсами возбуждения, рассчитываемая по формуле

$$I_{\text{avr}} = \frac{1}{T} \int_0^T F_{\text{exp}}(t) dt, \quad (3.2)$$

и $f_{\text{exp}}(t)$ – нормированная функция затухания флуоресценции (НФЗФ), отвечающая условию нормировки:

$$\frac{1}{T} \int_0^T f_{\text{exp}}(t) dt = 1. \quad (3.3)$$

Для нативных образцов склеры была проведена оценка степени вариации НФЗФ от области к области и от образца к образцу.

На рисунке 3.7 представлены примеры нормированных функций затухания флуоресценции для разных участков одного и того же образца в нативном состоянии для разных глубин. Из приведенных данных видно, что различия НФЗФ от участка к участку на одной и той же глубине являются значительными. Но, в то же время, при сравнении больших наборов НФЗФ для разных глубин (рисунок 3.8), можно заметить, что степень вариации НФЗФ для них приблизительно одинакова.

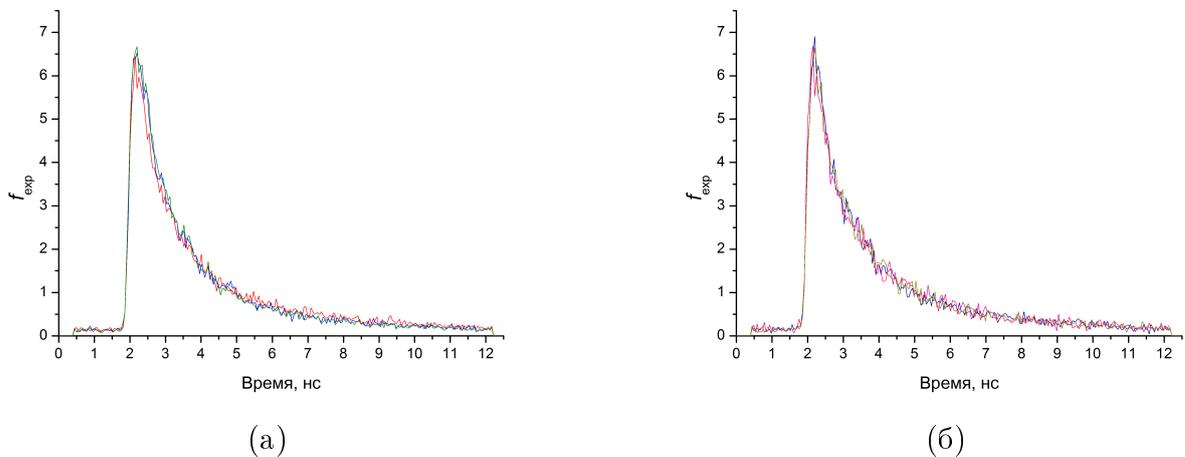


Рисунок 3.7. Нормированные функции затухания флуоресценции для разных участков одного образца необработанной склеры для глубин (а) 17 мкм, (б) 68 мкм. Цвет соответствует разным участкам.

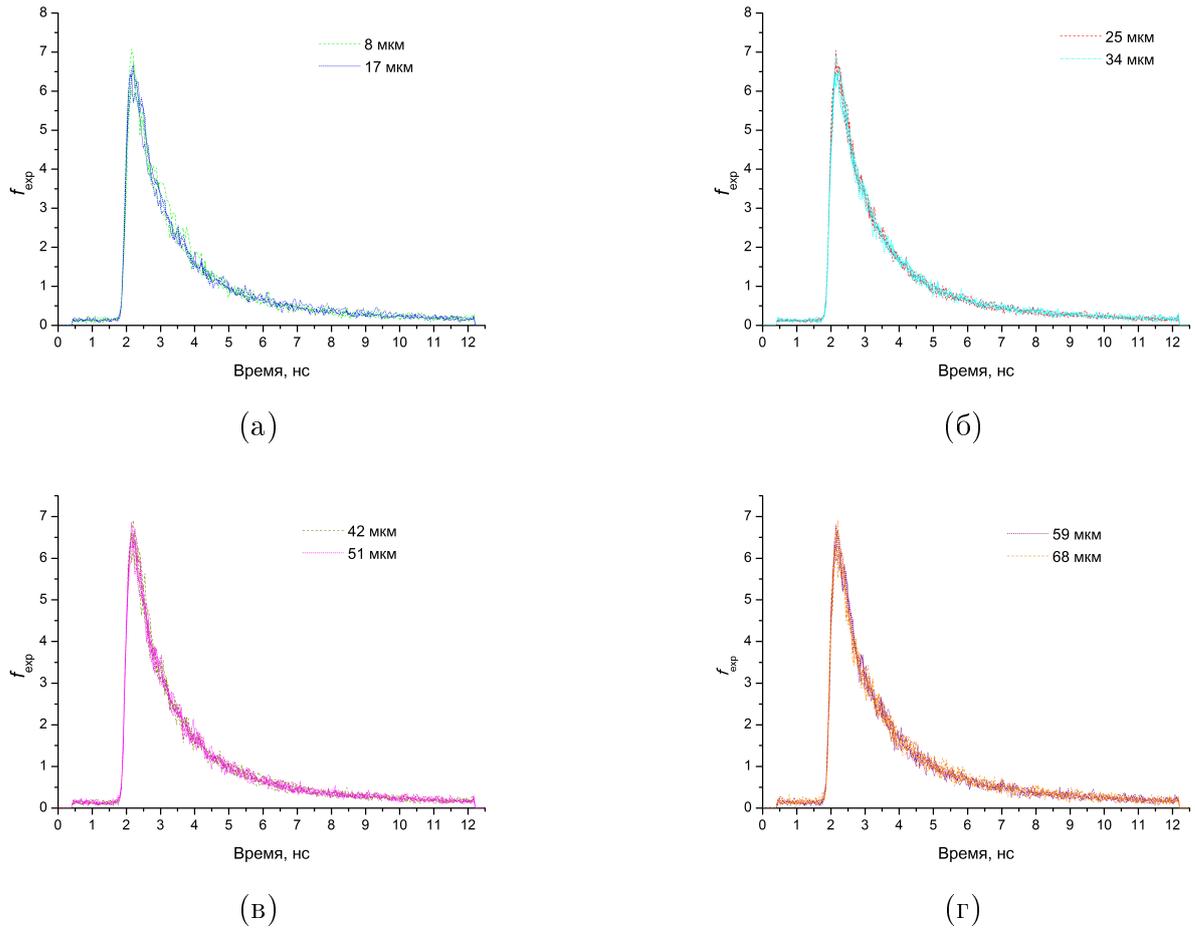


Рисунок 3.8. Нормированные функции затухания флуоресценции для разных участков одного образца необработанной склеры для глубин (а) 8 и 17 мкм, (б) 25 и 34 мкм, (в) 42 и 51 мкм, (г) 59 и 68 мкм.

Наиболее вероятной причиной значительной степени пространственной вариации локальных НФЗФ нативной склеры представляется вариация состава флуорофоров (или их молекулярного окружения) склеры и, в частности, вариация содержания эластиновых волокон в ткани (время жизни флуоресценции для эластина ($< 2,3$ нс) меньше, чем для коллагена ($< 5,3$ нс) [194]).

При сравнении усредненных по нескольким (5-7) участкам для одной глубины НФЗФ было установлено, что усредненные таким образом НФЗФ приблизительно одинаковы для разных глубин и для всех исследованных образцов нативной склеры (рисунок 3.9). Этот результат дает основание предполагать, что исследуемая ткань в интервале глубин 8–68 мкм является почти однородной (если сравнивать средние по площади для разных глубин) по составу и микроокружению флуорофоров, возбуждаемых на длине волны 380 нм.

В рутинных методиках микроскопической визуализации времени жизни флуоресценции используют двух-, реже – трех-, экспоненциальную аппроксимацию экспериментальных кривых затухания; однако, для количественной оценки вклада различных флуорофоров в ав-

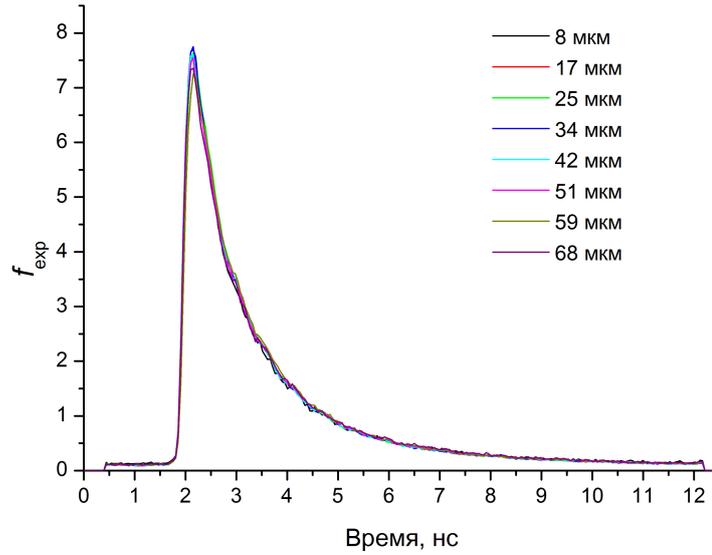


Рисунок 3.9. Средние нормированные функции затухания флуоресценции, полученные усреднением по нескольким участкам разных образцов нативной склеры, для различных глубин.

тофлуоресценцию ткани такой подход представляется не очень надежным, хотя бы в силу невозможности достаточно точного учета аппаратной функции системы регистрации. Нами в данных целях был использован метод декомпозиции с использованием эмпирических базисных функций, являющихся по своей природе сверткой кинетики затухания с аппаратной функцией.

В результате анализа всего массива полученных данных было установлено, что любая локальная НФЗФ $f_{\text{exp}}(t)$ необработанной склеры (эндогенных флуорофоров склеры) может быть с высокой точностью представлена в виде комбинации трех базисных функций:

$$f_{\text{exp}}(t) \approx f_{\text{fit}}(t) = a_{s1}f_{s1}(t) + a_{s2}f_{s2}(t) + a_{s3}f_{s3}(t). \quad (3.4)$$

Базисные функции $f_{s1}(t)$, $f_{s2}(t)$ и $f_{s3}(t)$ (см. рисунок 3.10) были получены в результате обработки данных для 7 образцов нативной склеры (45-90 областей с разных глубин для каждого образца).

Коэффициенты a_{s1} , a_{s2} и a_{s3} могут быть определены посредством минимизации величины

$$S = \frac{1}{N} \sum_i^N (f_{\text{exp}}(t_i) - a_{s1}f_{s1}(t_i) - a_{s2}f_{s2}(t_i) - a_{s3}f_{s3}(t_i))^2, \quad (3.5)$$

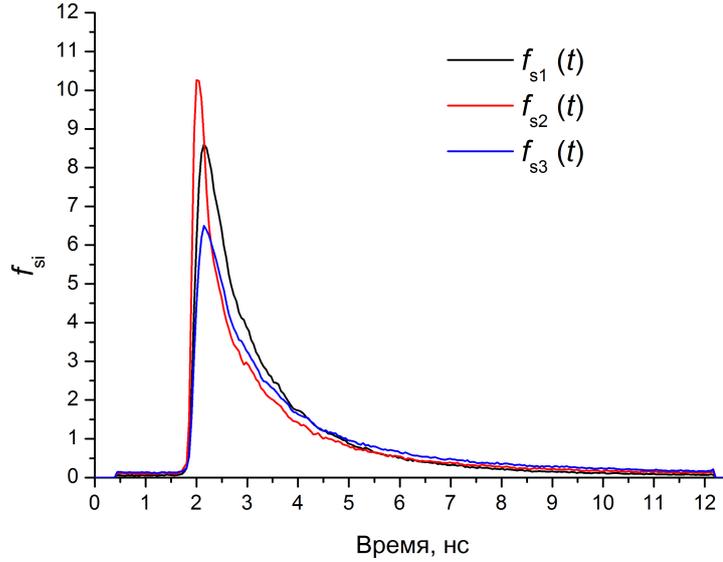


Рисунок 3.10. Эмпирические базисные функции для представления функций затухания флуоресценции склеры свиньи.

где t_i – значение временной переменной, соответствующее i -той точке кривой затухания, N – число временных отсчетов на кривой затухания, что приводит к следующим расчетным формулам:

$$\begin{pmatrix} a_{s1} \\ a_{s2} \\ a_{s3} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} & b_{13} \\ b_{21} & b_{22} & b_{23} \\ b_{31} & b_{32} & b_{33} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ c_3 \end{pmatrix}, \quad (3.6)$$

где $b_{jj} = \sum_i^N f_{sj}^2(t_i)$, $c_j = \sum_i^N f_{\text{exp}}(t_i) f_{sj}(t_i)$, где $j = 1, 2, 3$ $b_{12} = b_{21} = \sum_i^N f_{s2}(t_i) f_{s1}(t_i)$, $b_{13} = b_{31} = \sum_i^N f_{s3}(t_i) f_{s1}(t_i)$, $b_{23} = b_{32} = \sum_i^N f_{s3}(t_i) f_{s2}(t_i)$.

На рисунке 3.11 в качестве примера представлены функции $f_{\text{exp}}(t)$, аппроксимирующие функции $f_{\text{fit}}(t)$ и разностные функции $\Delta f = f_{\text{exp}}(t) - f_{\text{fit}}(t)$ для трех разных участков одного образца на одной и той же глубине, а также указаны найденные значения коэффициентов a_{s1} , a_{s2} и a_{s3} и соответствующие значения среднеквадратического отклонения \sqrt{S} . Из представленных данных видно, что значения коэффициентов разложения a_{s1} , a_{s2} и a_{s3} для разных участков существенно различаются, тогда, как точность аппроксимации является приблизительно одинаковой. Среднее значение среднеквадратического отклонения \sqrt{S} , полученное в результате обработки данных для 7 образцов, составило 0,0615, что свидетельствует о хорошей точности аппроксимации НФЗФ при использовании подобранных базисных функций.

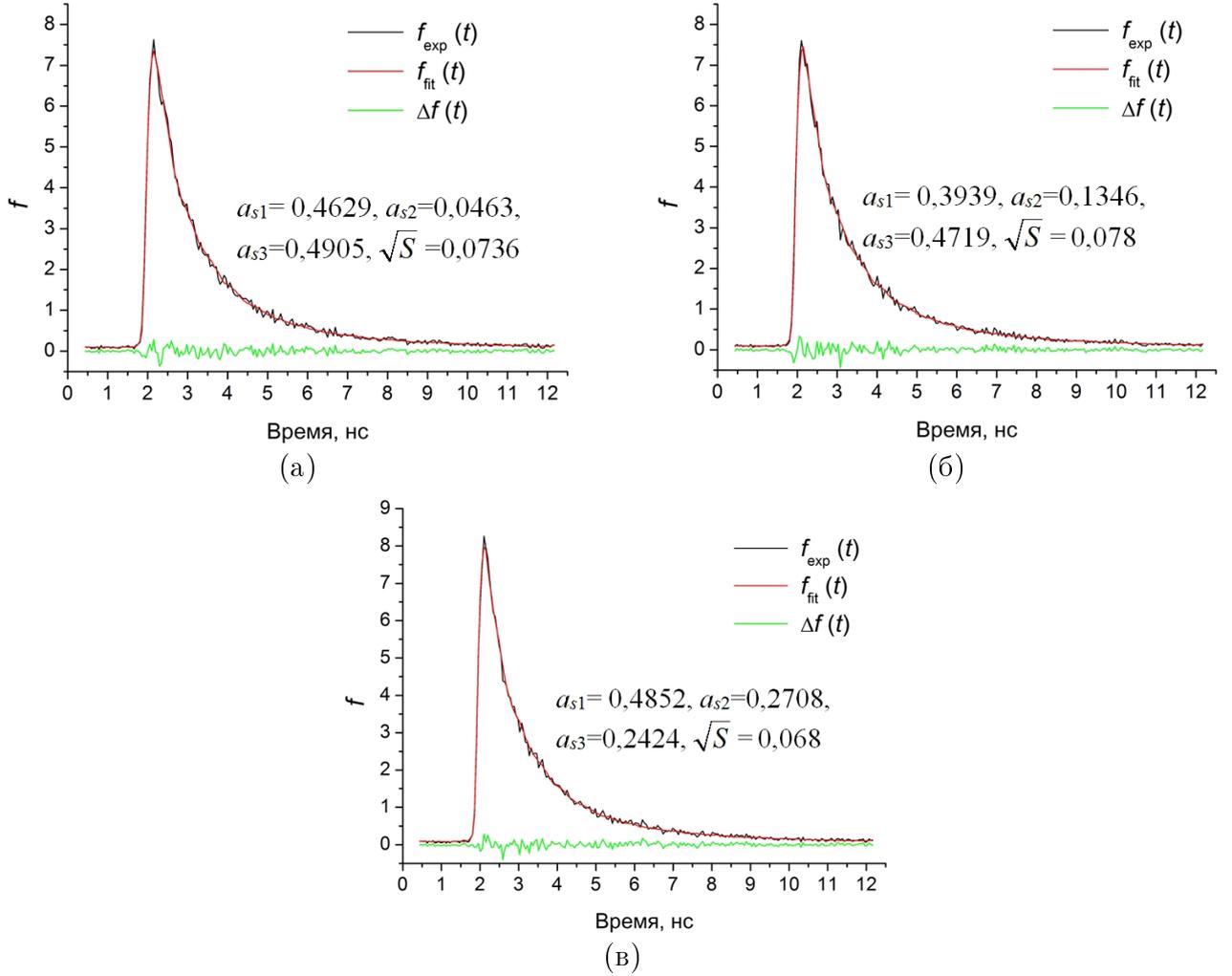


Рисунок 3.11. Аппроксимация функций затухания флуоресценции с трех разных участков образца нативной склеры линейной комбинацией базисных функций. Для каждого участка указаны значения коэффициентов разложения и среднеквадратического отклонения.

При анализе НФЗФ для образцов склеры, пропитанных рибофлавином, мы использовали декомпозицию по четырем базисным функциям, одна из которых, $f_r(t)$, соответствует рибофлавину:

$$f_{\text{fit}}(t_i) = a_{s1}f_{s1}(t_i) + a_{s2}f_{s2}(t_i) + a_{s3}f_{s3}(t_i) + a_r f_r(t_i). \quad (3.7)$$

Базисная функция для рибофлавина (рисунок 3.12) была получена в результате обработки данных НФЗФ для 0,1% водного раствора рибофлавина (15 областей). Коэффициенты a_{s1} , a_{s2} , a_{s3} и a_r рассчитывались путем минимизации величины:

$$S = \frac{1}{N} \sum_i^N (f_{\text{exp}}(t_i) - a_{s1}f_{s1}(t_i) - a_{s2}f_{s2}(t_i) - a_{s3}f_{s3}(t_i) - a_r f_r(t_i))^2. \quad (3.8)$$

Функция $f_r(t)$ является значительно более пологой по сравнению с функциями f_{si} ($i = 1,2,3$), что дает возможность выделить вклад флуоресценции рибофлавина с хорошей точно-

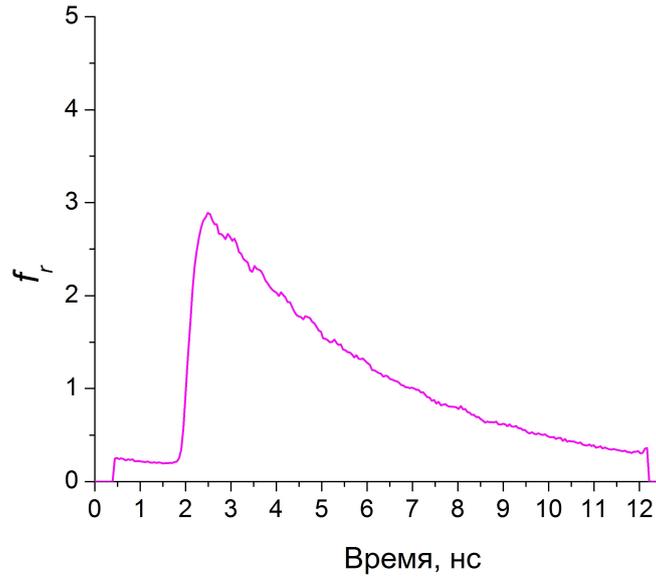


Рисунок 3.12. Эмпирическая базисная функция для рибофлавина.

стью. На рисунке 3.13 представлен пример аппроксимации функции затухания флуоресценции образца склеры, выдержанного в растворе рибофлавина. Параметры

$$A_s = \frac{a_{s1} + a_{s2} + a_{s3}}{a_{s1} + a_{s2} + a_{s3} + a_r} \text{ и } A_r = \frac{a_r}{a_{s1} + a_{s2} + a_{s3} + a_r} \quad (3.9)$$

рассматривались нами как меры относительного вклада в суммарную флуоресценцию образца флуоресценции эндогенных флуорофоров и рибофлавина, соответственно. Существенно, что величина параметров A_r и A_s не зависит от свойств ткани за пределами данного объема (в отличие от интенсивности регистрируемого сигнала флуоресценции). Для оценки относительного содержания рибофлавина в ткани на заданной глубине мы использовали следующий параметр:

$$R_r = \left\langle \frac{A_r}{A_s} \right\rangle_S \quad (3.10)$$

где скобки $\langle \dots \rangle_S$ обозначают усреднение по площади (по участкам, расположенным на одной глубине) при масштабах области усреднения порядка 100 мкм². При условии, что ткань является достаточно однородной в том смысле, что для протяженных слоев ткани средняя по площади концентрация эндогенных флуорофоров мало зависит от глубины залегания слоя, изменения параметра R_r пропорциональны изменениям концентрации рибофлавина.

Отметим, что использование разложений (3.4) и (3.7) оправдано лишь в диапазоне линейности отклика измерительной системы. Нами было экспериментально определено, что в условиях рассматриваемого эксперимента для уверенного попадания в этот диапазон средняя

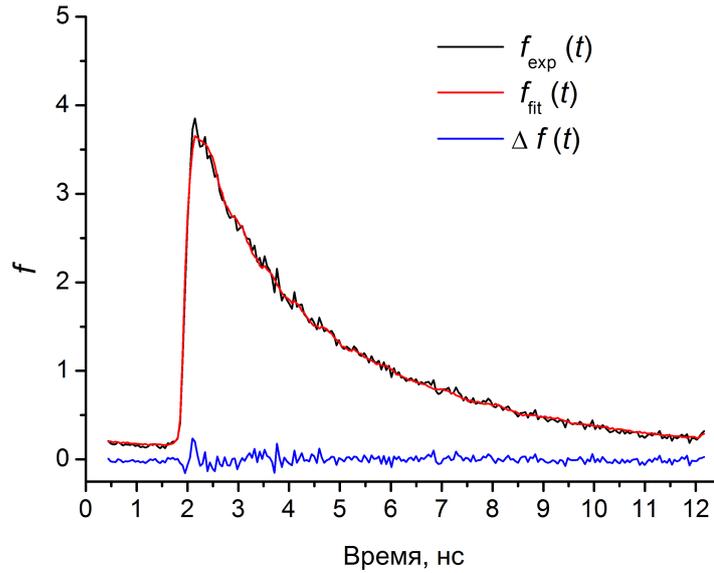


Рисунок 3.13. Аппроксимация функции затухания флуоресценции образца склеры, выдержанного в растворе рибофлавина, линейной комбинацией базисных функций. Значения коэффициентов разложения: $a_{s1} = 0,0185$, $a_{s2} = 0,1251$, $a_{s3} = 0,1637$, $a_r = 0,6955$.

интенсивность сигнала флуоресценции I_{avr} не должна превышать 900 (в единицах измерения прибора).

С учетом того, что изменение флуоресценции при УФ-обработке связано главным образом с превращением рибофлавина в лейкофлавин (нефлуоресцирующее вещество), в предположении о малости влияния на результаты флуоресцирующих продуктов фотохимических реакций, отличных от рибофлавина, разложение (3.7) использовалось нами и при анализе НФЗФ образцов, подвергнутых УФ-обработке. В этом случае параметр A_r может рассматриваться как мера вклада в суммарную флуоресценцию образца флуоресценции рибофлавина и тех флуоресцирующих продуктов фотолиза рибофлавина, которые имеют схожее с рибофлавином время затухания флуоресценции, а зависимость параметра R_r от глубины залегания как источник информации о пространственном распределении (пространственной вариации концентрации) указанных экзогенных флуорофоров.

3.3.2 Результаты измерений для разных стадий процедуры фотосшивания

На рис. 3.14 показан характер изменений нормированных функций затухания флуоресценции в областях с глубиной залегания до 80 мкм в ходе процедуры фотосшивания склеры с оптическим просветлением от одного этапа к другому. Показаны НФЗФ, полученные на

следующих стадиях: до УФ-обработки после пропитывания образца раствором рибофлавина (рис. 3.14(а)), до УФ-обработки после оптического просветления пропитанного рибофлавином образца в растворе глицерина (рис. 3.14(б)), сразу после УФ-обработки (рис. 3.14(в)), после выдерживания образца в физиологическом растворе 1 день (рис. 3.14(г)). На каждом из графиков показаны по 45–90 локальных НФЗФ для участков с различных глубин, равномерно покрывающих рассматриваемый интервал глубин (0–80 мкм), для одного из образцов склеры. Также на этих графиках показаны соответствующие разностные функции $\Delta f = f_{\text{exp}}(t) - f_{\text{fit}}(t)$, характеризующие точность аппроксимации экспериментальных кривых линейной комбинацией базисных функций (3.7), а также средние НФЗФ, полученные усреднением по локальным НФЗФ для всех рассматриваемых участков. На рис. 3.15 представлены на рис. 3.14 средние НФЗФ сравниваются между собой и со средней НФЗФ нативной склеры для рассматриваемого диапазона глубин. Параметр n указывает число участков, по которым проводилось усреднение. На рис. 3.16 показаны полученные зависимости параметра R_r от глубины залегания зондируемого слоя для разных стадий процесса фотосшивания с оптическим просветлением. Представленная кривая зависимости для первой стадии (сразу после выдерживания образца в растворе рибофлавина) была рассчитана усреднением данных для 4 образцов, остальные – для 2 образцов. Значение R_r для заданной глубины для каждого образца рассчитывалось усреднением по 4–10 участкам. Вертикальные планки показывают диапазон вариации R_r для заданной глубины от образца к образцу. На рисунках 3.17–3.19 представлены аналогичные данные для образца, подвергнутого фотосшиванию без оптического просветления. На рисунке 3.17 на каждом из графиков показаны 83–90 локальных НФЗФ для участков с различных глубин. Кривые зависимости R_r , представленные на рис. 3.19, были рассчитаны усреднением данных для 2 образцов. На рисунке 3.20 сравниваются средние по глубине НФЗФ для образцов, подвергнутых фотосшиванию с оптическим просветлением и без него, после УФ-обработки и выдерживания образца в физиологическом растворе 1 день.

Из данных, представленных на рис. 3.14–3.16, видно, что для образцов, подвергавшихся УФ-обработке в условиях оптического просветления, УФ-обработка приводила к сильному уменьшению вклада экзогенных флуорофоров в суммарную флуоресценцию (увеличивается крутизна НФЗФ, существенно уменьшается R_r), что ясно свидетельствует об интенсивном течении фотохимических реакций и превращении большей части рибофлавина в лейкофлавин. В случаях же, когда фотосшивание проводилось без оптического просветления существенных изменений свойств флуоресценции образца, обусловленных УФ-обработкой, не наблюдалось (рис. 3.17–3.19), что, по всей видимости, связано с низкой интенсивностью течения фотохи-

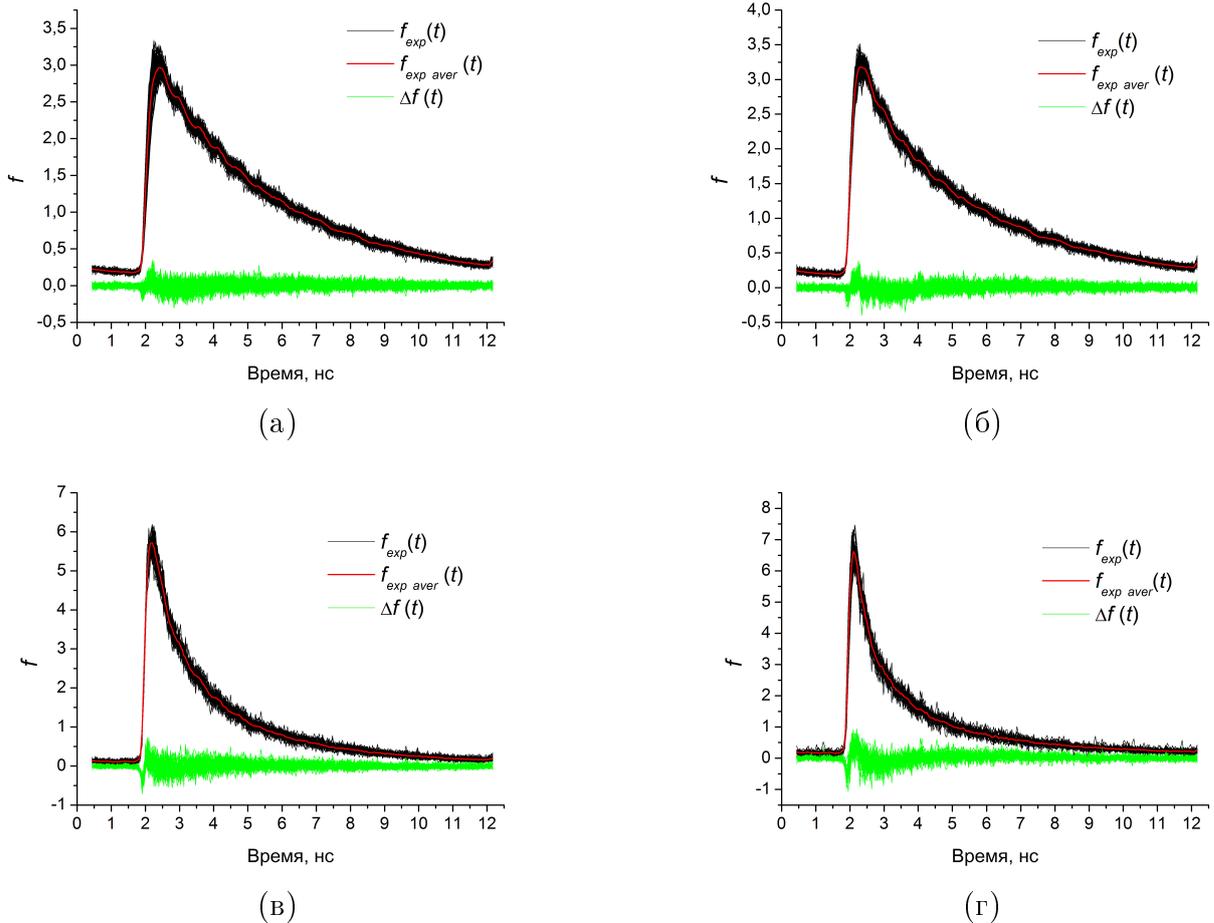


Рисунок 3.14. Вид нормированных функций затухания флуоресценции (НФЗФ) на разных стадиях процесса фотосшивания с оптическим просветлением: (а) до УФ-обработки после пропитывания образца раствором рибофлавина, (б) до УФ-обработки после оптического просветления пропитанного рибофлавином образца в растворе глицерина, (в) сразу после УФ-обработки, (г) после выдерживания в физиологическом растворе 1 день.

мических реакций. На этом основании можно сделать вывод, что иммерсионное оптическое просветление позволяет значительно увеличить интенсивность фотохимических реакций, сопровождающих фотосшивание.

Выдерживание образцов в растворе глицерина для оптического просветления не приводило к изменению формы НФЗФ (рис. 3.14(а), 3.14(б) и 3.15). При этом наблюдалось уменьшение флуоресценции рибофлавина с приповерхностных областей (значения R_r для этих областей после просветления оказались меньшими, чем до просветления, см. рис. 3.16). Вероятно, это связано с частичным вымыванием рибофлавина из приповерхностных областей при дегидратации ткани под действием иммерсионного агента.

После выдерживания фотосшитых образцов в физиологическом растворе 1 день флуоресцентные свойства образцов становились похожими на те, что были в нативном состоянии (рис. 3.18 и 3.15). На этой стадии существенных различий в оцениваемых свойствах флуорес-

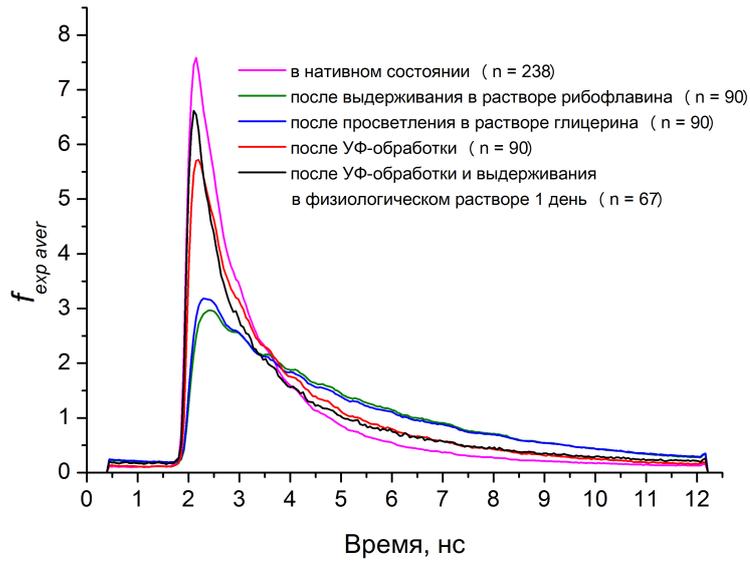


Рисунок 3.15. Сравнение средних нормированных функций затухания флуоресценции образца для разных стадий процесса фотосшивания с оптическим просветлением.

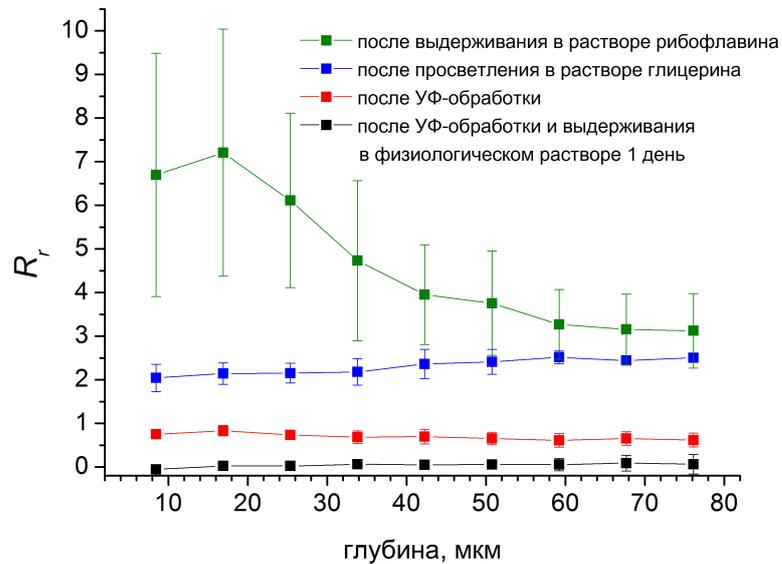


Рисунок 3.16. Зависимости R_r от глубины для образцов склеры на разных стадиях процесса фотосшивания с оптическим просветлением.

ценции для образцов, которые обрабатывались с просветлением и без него, не наблюдалось (рис. 3.20). Возможно, различие во флуоресценции между такими образцами удалось бы выявить, если бы была возможность исследовать зависимость НФЗФ от длины волны [195–197] (используемый нами томограф JenLab MPTflex такой возможности не давал). Заметим, что выявление изменений флуоресценции, обусловленных появлением фотосшивок, очень про-

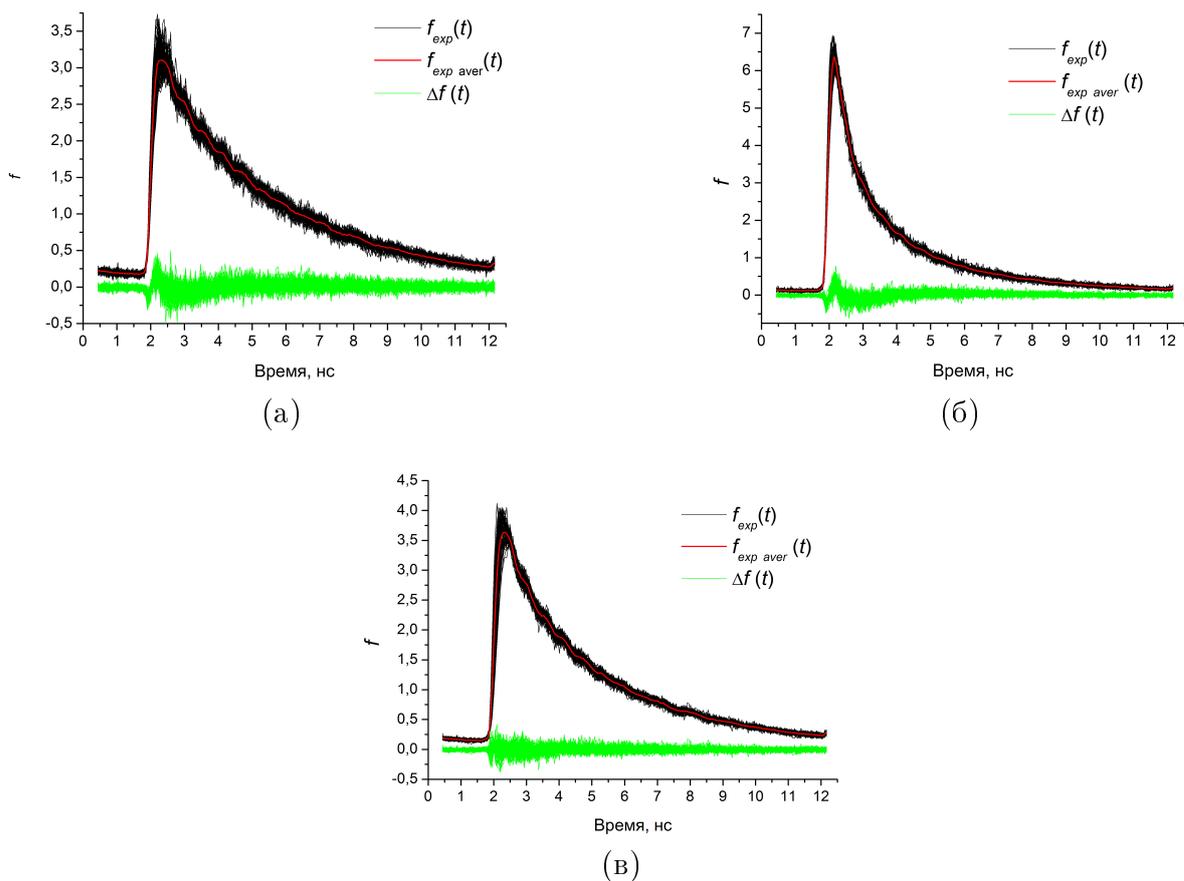


Рисунок 3.17. Вид нормированных функций затухания флуоресценции (НФЗФ) на разных стадиях процесса фотосшивания без оптического просветления: (а) до УФ-обработки после пропитывания образца раствором рибофлавина, (б) сразу после УФ-обработки, (в) после выдерживания в физиологическом растворе 1 день.

блематично из-за сложности их выделения на фоне изменений флуоресценции, обусловленных изменением концентрации флуоресцирующих продуктов фотолиза рибофлавина, таких как люмихром. Так, в работе [198] было отмечено увеличение флуоресценции ткани (роговица) в области 400–450 нм (длина волны возбуждения 380 нм) после рибофлавин/УФ фотосшивания. Авторами [198] это увеличение флуоресценции было связано с образованием сшивок, однако не представлено никаких доказательств того, что это увеличение не было связано с появлением в ткани люмихрома, вещества флуоресцирующего в указанной области спектра при возбуждении на длине волны 380 нм.

На всех стадиях мониторинга амплитуда разностных функций Δf была относительно мала, что свидетельствует о хорошей точности аппроксимации локальных НФЗФ функцией вида (3.7). Было замечено, что для системы склера–рибофлавин (склеры, пропитанной рибофлавином) разностная функция содержит, наряду со случайной, некоторую регулярную составляющую (рис. 3.21). Присутствие такой регулярной составляющей свидетельствует о взаимодействии компонент, приводящему к изменению флуоресценции. Форма этой регуляр-

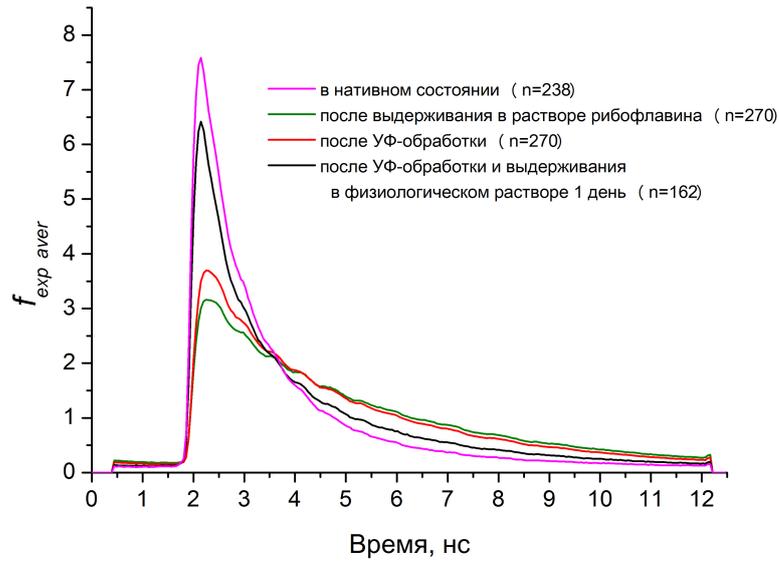


Рисунок 3.18. Сравнение средних нормированных функций затухания флуоресценции образца для разных стадий процесса фотосшивания без оптического просветления.

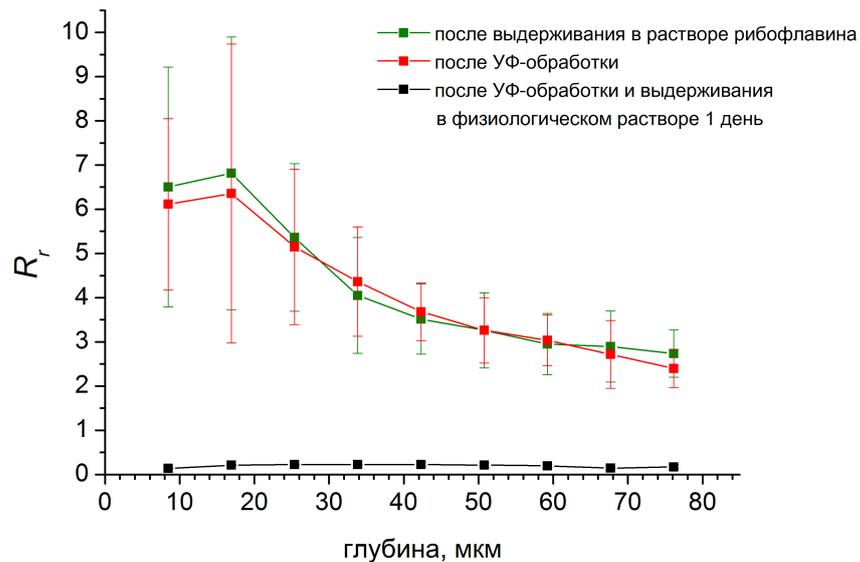


Рисунок 3.19. Зависимости R_r от глубины для образцов склеры на разных стадиях процесса фотосшивания без оптического просветления.

ной составляющей практически не изменялась на последующих стадиях обработки образца. Свою наибольшую амплитуду эта регулярная составляющая имела после последнего этапа обработки, то есть после выдерживания образцов в физиологическом растворе 1 день и на этой стадии была примерно одинаковой для образцов, фотосшитых в условиях оптического просветления и без него (рис. 3.20). Это позволяет утверждать, что указанная регулярная

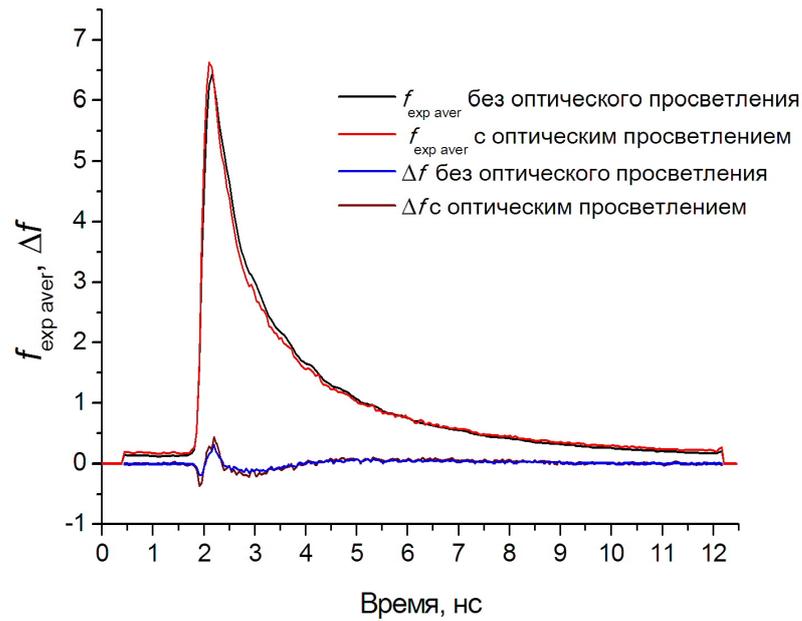


Рисунок 3.20. Сравнение средних нормированных функций затухания флуоресценции и разностных функций для образцов, подвергнутых фотосшиванию с оптическим просветлением и без него, после УФ-обработки и выдерживания образца в физиологическом растворе 1 день.

составляющая Δf при рассматриваемых условиях измерения не является информативной в плане оценивания эффективности фотосшивания.

Таким образом, результаты представленного эксперимента позволяют утверждать, что иммерсионное оптическое просветление способно значительно увеличить интенсивность протекания процесса фотосшивания склеры и тем самым позволяет увеличить количество фотосшивков, повышающих жесткость ткани, что подтверждает выводы главы 2.

3.4 Заключение к главе 3

Основные результаты исследований, представленных в данной главе, можно сформулировать следующим образом:

1. Исследованы возможности применения нелинейной конфокальной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции для контроля изменений, происходящих в ткани на разных стадиях процесса фотосшивания склеры.

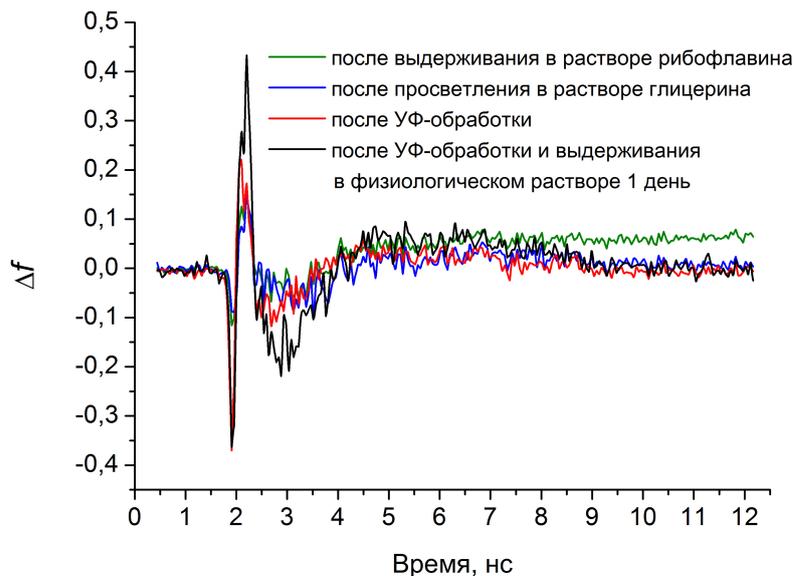


Рисунок 3.21. Разностные функции для образцов на разных стадиях процесса фотосшивания с оптическим просветлением.

2. Разработан и апробирован метод оценки вклада флуоресценции рибофлавина и флуоресцирующих продуктов фотолиза рибофлавина в регистрируемый сигнал флуоресценции от исследуемой области образца, основанный на декомпозиции функции затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям, соответствующим различным компонентам системы. Этот метод может быть использован для оценки интенсивности протекания фотохимических реакций, происходящих при фотосшивании склеры и роговицы, и оценки пространственной зависимости концентрации рибофлавина и его производных на разных стадиях процедуры фотосшивания.
3. Установлено, что иммерсионное оптическое просветление склеры способно значительно увеличить интенсивность генерации активных форм рибофлавина, участвующих в образовании сшивок.

Глава 4

Исследование характеристик коллагеновых волокон в условиях частичной дегидратации и иммерсионного просветления

Как уже отмечалось одним из факторов, подлежащем учету при проведении биомеханических исследований, в том числе, связанных с использованием фотосшивания, является степень гидратации ткани. Известно, что степень гидратации сильно влияет на механические свойства коллагенсодержащих тканей. Поэтому желательно иметь возможность осуществлять мониторинг содержания воды в ткани при проведении экспериментов. В ходе выполнения настоящей работы была разработана оригинальная методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии. Была экспериментально получена калибровочная кривая, позволяющая оценивать содержание воды по измеренному значению группового показателя преломления ткани. Разработанная методика представлена в разделах 4.1 и 4.2 настоящей главы. Метод ОКТ-мониторинга, использованный в этой методике, может быть использован и при изучении взаимодействия с тканью иммерсионных агентов, для оценки содержания воды и иммерсионного агента в ткани. Знание того, как изменяется состав жидкостей в ткани в процессе ее иммерсионного просветления и при вымывании иммерсионного агента из ткани, важно при применении иммерсионного просветления при фотосшивании. В рамках данной работы была разработана эффективная ОКТ-методика, позволяющая оцени-

вать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации. Эта методика представляется в разделе 4.3.4.

Как известно, ключевыми процессами, определяющими механизм иммерсионного просветления, являются осмотическая дегидратация ткани под действием иммерсионного агента (ИА) и диффузия иммерсионного агента в ткань. Сложность оптической характеристики процессов иммерсионного просветления отчасти обусловлена тем, что дегидратация ткани и диффузия ИА в ткань при близких к естественным уровням гидратации дают схожий оптический эффект, снижая рассеяние света в ткани. Поэтому составить достаточно полную картину протекания процессов дегидратации и диффузии ИА в ходе иммерсионного просветления, опираясь только на данные измерений оптических характеристик ткани, скажем ее коэффициента рассеяния или спектров отражения/пропускания [199, 200], затруднительно, если вообще возможно. Значительно более ясное представление о протекании этих процессов можно получить, отслеживая одновременно как изменения оптических свойств, так и изменения геометрических параметров ткани (см. напр. [8]), поскольку тенденции изменения объема ткани, определяемые осмотической дегидратацией и диффузией ИА, разнонаправлены: дегидратация приводит к уменьшению объема ткани, диффузия иммерсионного агента в ткань – к увеличению. При применении фотометрических и спектрофотометрических методов, широко используемых для характеристики действия иммерсионных агентов на биоткани [199], одновременный мониторинг оптических и геометрических характеристик образцов ткани сопряжен с большими трудностями и, как правило, требует прерывания естественного хода процесса просветления и перепозиционирования образца [8, 201], что отрицательно сказывается на точности измерений. Для некоторых типов тканей такой мониторинг может быть успешно осуществлен с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ). Методика ОКТ-мониторинга, представляемая в разделе 4.3.4, позволяет исследовать кинетику взаимодействия иммерсионных агентов с коллагеновыми волокнами на образцах вторичных сухожильных пучков. Основным достоинством этой методики является то, что она позволяет непрерывно, без переустановок образца, производить мониторинг, как геометрических параметров ткани, так и ее оптических параметров, в частности ее среднего группового показателя преломления, в ходе иммерсионного просветления. Поскольку средний показатель преломления ткани зависит от состава и объемного содержания тканевой жидкости, то по его измеренным значениям с учетом данных по изменению объема ткани можно оценить текущее содержание в ткани воды и иммерсионного агента.

Также в данной главе, в разделах 4.3.3 и 4.4, представлены результаты исследования изменений характеристик двулучепреломления коллагеновых волокон при дегидратации и

регидратации ткани, а также происходящих в результате взаимодействия ткани с иммерсионными агентами. Как показано в разделе 4.4, кинетика двулучепреломления позволяет оценить, как изменяется распределение воды между фибриллами и интерстициальной жидкостью при дегидратации и регидратации ткани. Также представленные результаты важны в плане совершенствования техники поляризационного картографирования коллагеносодержащих тканей (приложение Б). Результаты исследований, представленных в данной главе, опубликованы в работах [202–207].

4.1 Методика ОКТ-мониторинга характеристик коллагеновых пучков при их дегидратации, регидратации и иммерсионном просветлении

Разработанная методика предполагает проведение измерений на образцах вторичных коллагеновых пучков сухожилий. Наиболее удобными и доступными являются образцы вторичных коллагеновых пучков сухожилий хвоста крысы. Структура и состав первичных коллагеновых пучков (волокон), из которых состоят вторичные сухожильные пучки, аналогичны структуре и составу коллагеновых волокон склеры, дермы, стенок кровеносных сосудов, створок сердечных клапанов и т.п. По упаковке фибрилл в волокнах и распределению диаметров фибрилл сухожилия схожи со склерой. Диаметр подавляющей части коллагеновых фибрилл в сухожилиях лежит диапазоне от 20 до 300 нм [24, 47, 48], в склере – от 20 до 230 нм [24]. В ненагруженном состоянии вторичным коллагеновым пучкам характерен волнообразный ход волокон, при этом близкорасположенные волокна идут параллельно друг другу. При небольшом натяжении пучка ориентация волокон в нем становится почти однородной. Строение вторичных коллагеновых пучков сухожилий хорошо изучено; оно описано в деталях в работах [45–48]. Массовое содержание коллагена в сухожилиях составляет обычно 24–38%, а воды – 55–72% [43–45]. Для сравнения, массовая доля воды в нормальной склере составляет 68%, коллагена – 27% [22], в роговице – 76% и 15% [24], соответственно. Вторичные сухожильные пучки, чей диаметр обычно лежит в пределах от 250 до 500 мкм, в десятки раз толще по сравнению с коллагеновыми пучками в других типах тканей, что делает их очень удобными для экспериментов. Благодаря своей относительно простой структуре и доступности, вторичные сухожильные пучки хвоста крысы являются очень популярным модельным объектом для изучения физических и физиологических свойств коллагеновых волокон и коллагеносодержащих тканей.

Суть разработанной методики состоит в одновременном мониторинге, с помощью оптической когерентной томографии, изменений площади сечения исследуемого коллагенового пучка и его среднего группового показателя преломления, а также, при необходимости, среднего группового показателя двулучепреломления.

Перед измерениями исследуемый коллагеновый пучок, погруженный в физиологический раствор (0,9% водный раствор хлорида натрия), слегка натягивается и закрепляется зажимами на предметном стекле (рис. 4.1). Затем он накрывается покровным стеклом и для получения скана поперечного сечения пучка в нативном состоянии устанавливается в ОКТ-систему так, чтобы направление пучка было перпендикулярно направлению В-сканирования. Затем покровное стекло снимается и быстро, с помощью фильтровальной бумаги, с поверхности предметного стекла удаляется физиологический раствор. После этого, если исследуется взаимодействие ткани с иммерсионным агентом, пучок окружается большим количеством иммерсионного агента, снова накрывается покровным стеклом – количество агента, окружающего образец, должно быть достаточно большим, чтобы можно было пренебречь изменением среднего показателя преломления агента за счет выхода в него воды из образца – и устанавливается в ОКТ-систему в том же положении. Если осуществляется воздушная дегидратация, образец не накрывается покровным стеклом. При исследовании регидратации высушенный пучок в закрепленном состоянии окружается физраствором и накрывается покровным стеклом. С момента установки через определенные промежутки времени, сначала малые (порядка 20 секунд), затем несколько большие, фиксируются ОКТ-изображения, отображающие поперечное сечение исследуемого пучка и верхнюю границу предметного стекла. Примеры изменения ОКТ-изображений пучков в процессе иммерсионного просветления показаны на рисунке 4.2.

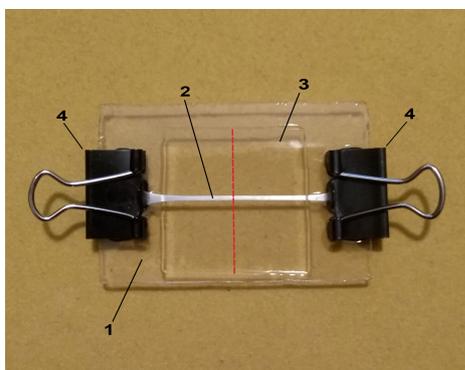


Рисунок 4.1. Крепление образца на предметном стекле при иммерсионном просветлении. 1 – предметное стекло, 2 – образец, 3 – покровное стекло, 4 – зажимы. Красной пунктирной линией показано расположение плоскости сканирования.

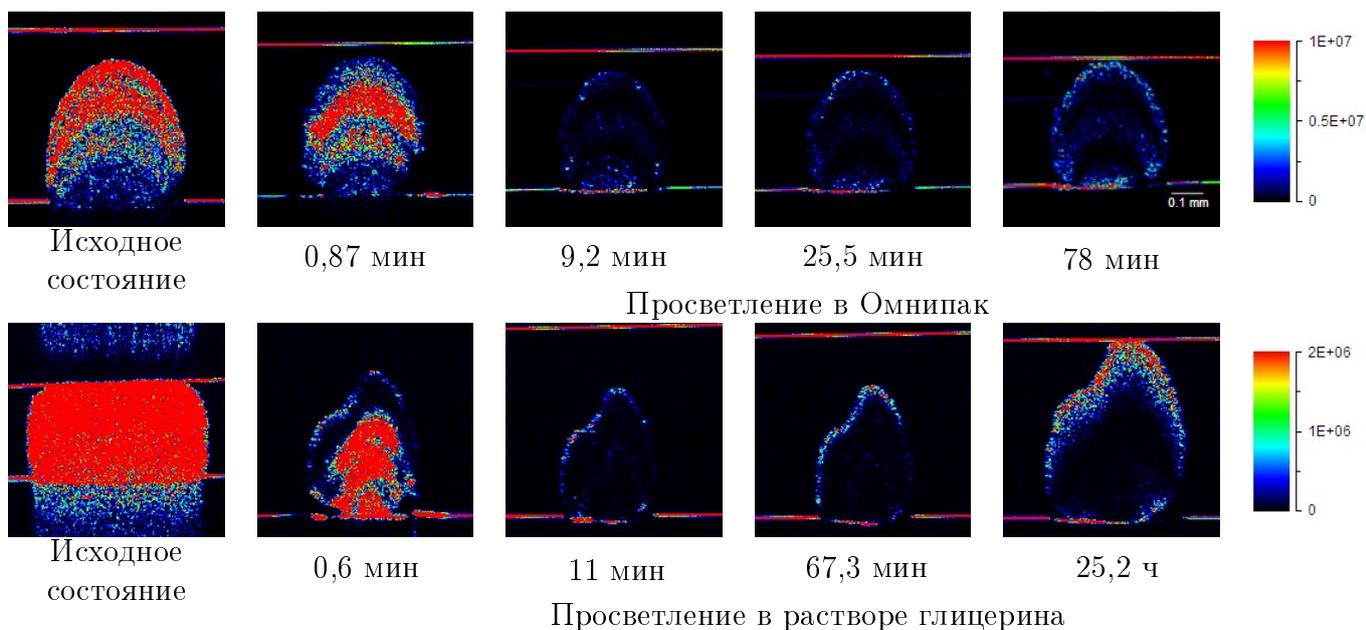


Рисунок 4.2. Серии ОКТ-сканов образцов сухожильных пучков, просветлявшихся в Омнипак-300 и в 82,3% растворе глицерина. Показаны сканы образцов в исходном состоянии (в физрастворе) и после их погружения в иммерсионный агент в разные моменты времени с момента погружения. Масштаб на всех сканах одинаков. Цветами показана интенсивность ОКТ-сигнала.

Для измерений нами использовался томограф ThorLabs-ОСР930SR (центральная длина волны зондирующего излучения $\lambda_0 = 930$ нм, ширина полосы – 100 нм).

Используемые способы оценки средних групповых показателей преломления и двулучепреломления ткани, а также степени изменения объема исследуемого коллагенового пучка по полученным ОКТ-изображениям представлены в следующих трех подразделах.

4.1.1 Экспериментальная оценка среднего группового показателя преломления ткани

В рассматриваемой методике исследуемый коллагеновый пучок располагается между предметным и покровным стеклами в физиологическом растворе или иммерсионной жидкости или, при воздушном высушивании, находится в натянутом состоянии на небольшом расстоянии над предметным стеклом. Во всех этих случаях показатель преломления ткани может быть оценен по смещению изображения верхней поверхности предметного стекла под образцом. Как видно из томограмм, приведенных на рисунке 4.2, изображение верхней границы подложки под образцами, находящимися в иммерсионной жидкости, смещается со временем, свидетельствуя об изменении оптической длины пути света через образец. Как известно [208–212], расстояние $R_{\text{ОСТ}_z}$ между изображениями двух точек, расположенных на одной линии вертикального зондирования (А-скане), на ОКТ-изображении пропорциональ-

но оптической длине пути между этими двумя точками (l), определенной через средний групповой показатель преломления среды на пути между этими точками (n_{ga}),

$$R_{\text{OCTz}} \sim l = n_{ga}d, \quad (4.1)$$

где d – геометрическое (физическое) расстояние между этими точками. В рассматриваемой геометрии это может быть использовано для оценки среднего группового показателя преломления ткани, n_t . Принцип измерения проиллюстрирован на рисунке 4.3. На ОКТ-изображении, показанном на этом рисунке, отмечены точки пересечения некоторой линии А-сканирования с верхней (А) и нижней (В) поверхностями образца ткани, а также с изображением верхней поверхности предметного стекла в отсутствие (С) и при наличии (D) образца. Обозначим средний групповой показатель преломления образца на этой линии сканирования n_1 . Тогда оптическая длина пути через образец на данной линии сканирования (длина отрезка АВ на рис. 4.3) будет определяться как $l_S = n_1d_S$, где d_S – геометрическая длина пути через образец. В отсутствие образца той же геометрической длине пути d_S соответствовала бы оптическая длина пути n_0d_S , где n_0 – групповой показатель преломления среды, окружающей образец (физиологический раствор, иммерсионная жидкость или воздух). Смещение точки изображения верхней поверхности предметного стекла при наличии образца относительно ее положения в отсутствие образца на ОКТ-изображении, Δ_R (длина отрезка CD на рис. 4.3), можно выразить как

$$\Delta_R = l_S - n_0d_S = l_S - n_0 \frac{l_S}{n_1}. \quad (4.2)$$

Поэтому, определив по ОКТ-скану величины Δ_R и l_S , можно рассчитать показатель преломления n_1 по формуле

$$n_1 = \frac{n_0 l_S}{l_S - \Delta_R}. \quad (4.3)$$

Способы оценки показателя преломления, использующие этот принцип измерения, широко применяются на практике (см. напр. [211]). Средний групповой показатель преломления образца n_t рассчитывался нами посредством усреднения значений n_1 , полученных для 3–5 линий А-сканирования. По нашим оценкам при высоте поперечного сечения образца больше 300 мкм описанный способ может обеспечить точность определения n_t порядка 0,003–0,005. Групповые показатели преломления иммерсионных агентов и воды рассчитывались нами по спектральным зависимостям фазового показателя преломления материала в соответствии с

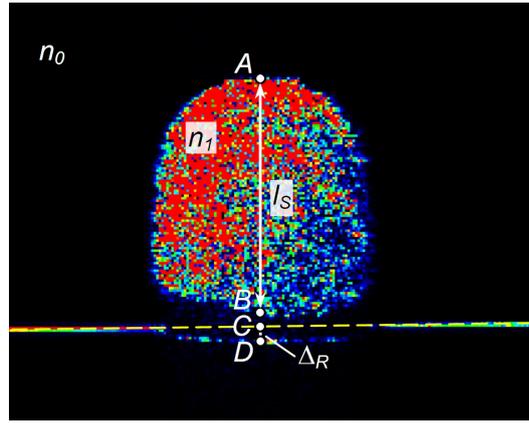


Рисунок 4.3. Параметры, используемые в вычислениях среднего группового показателя преломления ткани по ОКТ-изображениям образца.

общей формулой [212, 213]:

$$n_g(\lambda_0) = n_p(\lambda_0) - \lambda_0 \left. \frac{dn_p}{d\lambda} \right|_{\lambda=\lambda_0}, \quad (4.4)$$

где n_p и n_g – соответственно фазовый и групповой показатели преломления среды, а λ_0 – центральная длина волны зондирующего излучения в вакууме (в нашем случае $\lambda_0 = 930$ нм). Для измерений фазовых показателей преломления иммерсионных агентов использовался многоволновый рефрактометр Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония). Групповой показатель преломления физиологического раствора при обработке данных предполагался приближенно равным групповому показателю преломления воды. Для расчета группового показателя преломления воды мы использовали данные работы [214] по спектральной зависимости фазового показателя преломления, давшие значение $n_g = 1,3416$ для $\lambda_0 = 930$ нм. Групповой показатель преломления воздуха брался равным единице.

Предположение об однородности показателя преломления среды, окружающей образец, полностью оправдано при измерении показателя преломления образца в исходном состоянии, когда образец находится в физрастворе. При иммерсионном просветлении, которое на начальном этапе сопровождается быстрой дегидратацией ткани, неоднородность показателя преломления окружающей среды имеет место из-за диффузии воды, выходящей из образца, в объеме иммерсионного агента. На этапах, когда вода, вышедшая из образца, оказывается достаточно равномерно распределенной по объему жидкости, окружающей образец, предположение о приближенной однородности показателя преломления этой жидкости также является оправданным. При этом, исходя из того, что объем иммерсионного агента многократно превышает объем вышедшей в него воды, можно считать показатель преломления окружающей среды приблизительно равным исходному показателю преломления иммерсионного агента. На стадии быстрой дегидратации, в течение 5-10 минут после погружения

образца в иммерсионную жидкость, концентрация воды в иммерсионной жидкости вблизи образца оказывается значительно выше, чем на некотором удалении от него, и, соответственно, показатель преломления окружающей среды вблизи образца оказывается существенно ниже, чем вдали от него. Указанием на существование большого градиента показателя преломления в окрестности образца является искривление изображения поверхности подложки вне области геометрической проекции образца на ОКТ-сканах. В качестве примера на рисунке 4.4(а) приведен ОКТ-скан для сухожильного пучка (образец Р1), просветляемого в растворе пропиленгликоля, через 1,3 минуты после его погружения в иммерсионную жидкость. Зоны искривления изображения границы предметного стекла, обусловленного неоднородностью показателя преломления жидкости, окружающей образец, указаны стрелками. По величине смещения изображения верхней границы предметного стекла можно количественно оценить отношение среднего группового показателя преломления жидкости вблизи образца для данного А-скана (n'_{0A}) к исходному показателю преломления иммерсионного агента (n_0) по формуле:

$$\frac{n'_{0A}}{n_0} = \left(1 + \frac{\Delta_A}{l_A}\right)^{-1}, \quad (4.5)$$

где l_A – оптическая длина пути света через иммерсионную жидкость в отсутствие градиента показателя преломления для данного А-скана и Δ_A – величина смещения изображения верхней границы предметного стекла, обусловленного изменением показателя преломления окружающей среды. На рисунке 4.4(б) в качестве примера показано, как изменялось отношение n'_{0A}/n_0 как функция расстояния r от линии А-скана до образца со временем с момента погружения образца Р1 в раствор пропиленгликоля. Из этого рисунка видно, что в течение первых полутора-двух минут градиент показателя преломления увеличивался и достиг максимума. Затем он начал уменьшаться и через 7–8 минут с момента погружения образца в иммерсионную жидкость, вскоре после окончания стадии быстрой дегидратации, практически исчез.

Отмеченные пространственные вариации показателя преломления окружающей образец среды в определенных ситуациях должны учитываться при определении среднего показателя преломления ткани на стадии быстрой дегидратации. Негативное влияние неоднородности среды, окружающей образец, на точность определения показателя преломления становится существенным, когда над и/или под образцом находится значительная толща иммерсионного агента. В таких случаях, значительное улучшение точности оценок достигается использованием для расчета показателя преломления n_A вместо формулы (4.3) следующей формулы,

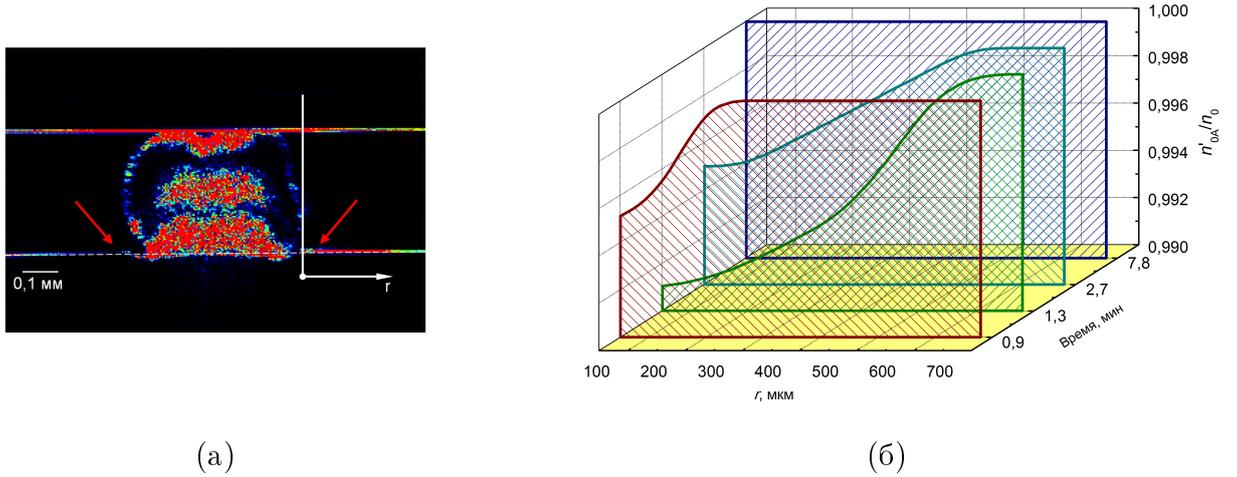


Рисунок 4.4. (а) ОКТ-скан сухожильного пучка (образец P1), полученный через 1,3 минуты после его погружения в раствор пропиленгликоля, (б) зависимость отношения среднего группового показателя преломления жидкости вблизи образца к исходному показателю преломления иммерсионного агента от расстояния от линии А-сканирования до образца.

частично учитывающей неоднородность среды вокруг образца,

$$n_A = \frac{n_0 l_S}{l_S - \Delta_R} \left[1 + \frac{L_1 + L_2}{L_S} \left(1 - \frac{n'_{0A}}{n_0} \right) \right]^{-1}, \quad (4.6)$$

где L_S – толщина образца на данной линии сканирования, L_1 и L_2 – значения толщины слоя жидкости над и под образцом на этой линии, n'_{0A} – значение среднего показателя преломления окружающей среды для некоторой линии А-сканирования в непосредственной близости от образца, рассчитанное по формуле (4.5). Величина отношения $(L_1 + L_2)/L_S$ с достаточной для данной коррекции точностью может быть рассчитана по рассматриваемому ОКТ-скану. Мы использовали эту коррекцию при обработке данных в случаях просветления в ПЭГ и растворе глицерина.

4.1.2 Способ оценки среднего группового показателя двулучепреломления ткани

Хотя используемый нами для ОКТ-измерений томограф ThorLabs-ОСР930SR не относится к классу поляризационно-чувствительных ОКТ-систем (PS-ОКТ), а именно поляризационно-чувствительные томографы обычно применяются для оценки двулучепреломления биологических тканей [215], в условиях рассматриваемого эксперимента с его помощью возможно произвести подобные измерения. Эта возможность связана с тем, что зондирующий пучок в этом томографе является частично линейно-поляризованным с прева-

лирующей долей поляризованной компоненты. При оценке двулучепреломления образцов томограф настраивался так, чтобы плоскость преимущественной поляризации падающего на образец света была ориентирована под углом 45° к плоскости сканирования. Тестовые измерения, проведенные при помещенном в предметное плечо поляризаторе, показали, что степень поляризации зондирующего пучка составляла около 0,9.

Локальная оптическая ось коллагенового волокна, которая соответствует большему показателю преломления, параллельна направлению его хода (направлению преимущественной ориентации фибрилл). В представляемой методике исследуемый коллагеновый пучок позиционируется перпендикулярно плоскости сканирования. Поскольку пучок натянут, и ориентация коллагеновых волокон в пучке является почти однородной, ориентация эффективной локальной оптической оси пучка также является практически однородной, параллельной его геометрической оси (см. приложение Б). При ориентации плоскости преимущественной поляризации падающего света под углом 45° к оси сухожильного пучка при прохождении света через ткань его состояние поляризации изменяется из-за двулучепреломления. На ОКТ-изображениях пучка наблюдается модуляция сигнала, обусловленная этим изменением. Большая часть света, отраженного с определенных глубин образца, а именно, с глубин h , отвечающих условию

$$h = \frac{\lambda_0}{4\Delta n_a(h)} (1 + 2m), m = 0, 1, 2, \dots, \quad (4.7)$$

где $\Delta n_a(h)$ – средний групповой показатель двулучепреломления образца на пути от верхней границы до глубины h , при выходе из него оказывается поляризованной ортогонально направлению преимущественной поляризации падающего света и не интерферирует с опорным пучком. Поэтому ОКТ-сигнал с этих глубин является минимальным. Этим глубинам соответствуют темные полосы на ОКТ-изображениях образца (см. рис. 4.2 и 4.5). Как следует из (4.7), при известном h эффективный групповой показатель двулучепреломления ткани Δn_a для длины волны $\lambda = \lambda_0$ может быть вычислен как

$$\Delta n_a = \frac{\lambda_0 (1 + 2m)}{4h}. \quad (4.8)$$

Приближенное значение h для полосы порядка m (рис. 4.5) может быть найдено по глубине расположения центра этой полосы на ОКТ-изображении, $d_{m\text{ОКТ-pix}}$, выраженной в пикселях, следующим образом

$$h = \frac{d_{m\text{ОКТ-pix}} a_{\text{pm}}}{n_t}, \quad (4.9)$$

где a_{pm} – выраженная в миллиметрах физическая высота области, приходящейся на один пиксель изображения при показателе преломления отображаемой среды, равном 1 (это инструментальный параметр, в нашем случае $a_{\text{pm}} = 0,003158$ мм/пиксель), и n_t – средний групповой показатель преломления ткани, рассчитанный по этому же скану. Средний групповой показатель двулучепреломления ткани, Δn_t , вычислялся нами по значениям Δn_a для наблюдаемых полос максимального порядка m с использованием формул (4.8) и (4.9) для 3-7 линий А-сканирования.

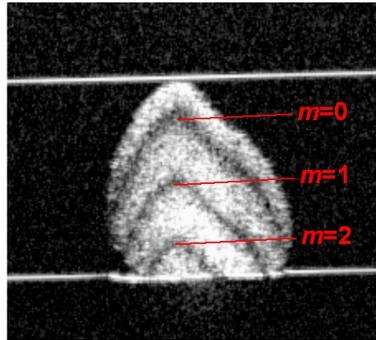


Рисунок 4.5. Интерференционные полосы, обусловленные двулучепреломлением ткани, на ОКТ-изображении коллагенового пучка.

4.1.3 Экспериментальная оценка коэффициента изменения объема ткани

Одним из параметров, отслеживаемых в рассматриваемой методике, является коэффициент изменения объема пучка, определяемый как

$$k_s = \frac{V}{V_0}, \quad (4.10)$$

где V и V_0 – значения объема заданного сегмента (отрезка) пучка в заданный момент времени и в исходном состоянии, соответственно. Напомним, что в нашем случае концы исследуемого коллагенового пучка зафиксированы, и он изначально находится в слегка натянутом состоянии. Как показали эксперименты с использованием различных иммерсионных агентов, закрепленный таким образом коллагеновый пучок, остается в натянутом состоянии на всех стадиях взаимодействия с иммерсионным агентом в течение нескольких дней. При воздушном высушивании и последующей регидратации пучок также остается в натянутом состоянии. Поэтому для количественного контроля изменения объема ткани при обезвоживании и набухании в данной геометрии эксперимента достаточно следить за изменением площа-

ди сечения пучка. Поскольку длина пучка не изменяется, k_s может рассчитываться через соответствующие площади сечения пучка как

$$k_s = \frac{S}{S_0}, \quad (4.11)$$

что и используется в рассматриваемой методике.

Площадь поперечного сечения исследуемого коллагенового пучка, S , рассчитывалась по площади его изображения на ОКТ-скане как

$$S = \frac{S_{\text{ОКТ-пик}} a_{\text{ps}}}{n_t}, \quad (4.12)$$

где $S_{\text{ОКТ-пик}}$ – площадь изображения сечения пучка на ОКТ-скане в пикселях, a_{ps} – инструментальный параметр, численно равный площади области, приходящейся на один пиксель изображения, в квадратных миллиметрах, при показателе преломления отображаемой среды, равном 1 (в нашем случае $a_{\text{ps}} = 1,263 \cdot 10^{-5}$ мм²/пиксель), и n_t – средний групповой показатель преломления исследуемого пучка, рассчитанный по этому же скану. Для определения площади поперечного сечения пучка на ОКТ-изображении нами использовалась программа Icy [177].

4.1.4 Образцы. Свойства образцов в исходном состоянии

Образцы вторичных сухожильных пучков были получены из хвостов зрелых лабораторных крыс. До момента измерений образцы хранились в физиологическом растворе не более 7 дней. Никаких статистически значимых изменений площади сечения пучков и их оптических характеристик, а именно средних групповых показателей преломления и двулучепреломления, в течение данного срока хранения зафиксировано не было. В качестве примера на рисунке А.3 в приложении А представлены данные для образцов одной из серий экспериментов.

Для измерений нами использовались пучки диаметром от 300 до 450 мкм. Относительно небольшой диаметр таких пучков позволял получать четкое ОКТ-изображение верхней границы предметного стекла под образцом, даже когда образец находится в нативном состоянии, и его положение могло быть определено с высокой точностью. Это обеспечивало хорошую точность измерений как среднего группового показателя преломления ткани, так и площади сечения пучка. При большем диаметре пучков изображения верхней границы предметного стекла под образцом не было видно или оно было сильно размытым. При меньшем диаметре

пучков значения Δ_R и l_S были слишком маленькими для достаточно точного определения показателя преломления n_t . Приведенные в разделе 4.1.1 оценки точности определения n_t соответствуют указанному диапазону диаметров образцов (300–450 мкм).

Одним из факторов, подлежащим учету при проведении оптических экспериментов с коллагеновыми пучками, является сильная поляризационная зависимость характеристик рассеяния коллагеновых волокон при близких к нативным уровнях гидратации. Если свет падает на пучок перпендикулярно его оси, при однородной или близкой к однородной ориентации коллагеновых волокон в пучке составляющая падающего света, линейно поляризованная параллельно оси пучка, рассеивается значительно сильнее, чем составляющая, имеющая плоскость поляризации перпендикулярную оси пучка. Проведенные нами эксперименты показали, что при работе со вторичными сухожильными пучками диаметром от 300 до 450 мкм в нативном состоянии или состояниях, близких к нативному, при ориентации плоскости поляризации зондирующего параллельно оси пучка рассеяние света в ткани является столь сильными, что сигнал отражения от фронтальной границы стеклянной подложки в области за образцом не может быть зарегистрирован на фоне шумового сигнала, обусловленного многократным рассеянием (рис. 4.6(а)). Это делает невозможными прямые измерения группового показателя преломления при указанной ориентации плоскости поляризации падающего света относительно оси исследуемого коллагенового пучка. При ориентациях плоскости поляризации зондирующего излучения перпендикулярно оси коллагенового пучка (рис. 4.6(б)) или под углом 45° относительно этой оси для пучков диаметром указанного диапазона экспериментальная оценка групповых показателей преломления ткани оказались возможными при любых уровнях гидратации ткани. Для образца, ОКТ-изображения которого представлены на рисунке 4.6, по наклону зависимости ОКТ-сигнала от глубины [169] были оценены коэффициенты ослабления ткани для света, поляризованного параллельно ($\mu_{t\parallel}$) и перпендикулярно ($\mu_{t\perp}$) направлению хода волокон. Они составили $\mu_{t\parallel} = 170,2 \pm 5,2 \text{ см}^{-1}$ и $\mu_{t\perp} = 89,6 \pm 5,4 \text{ см}^{-1}$ ($\lambda_0=930 \text{ нм}$). Степень объемной гидратации и содержание воды в ткани (см. раздел 4.2) для данного образца в момент измерений составили приблизительно 2,46 и 0,71, соответственно. Заметим, что оптические свойства ткани в пределах зондируемой области коллагенового пучка были достаточно однородными для надежного определения $\mu_{t\parallel}$ и $\mu_{t\perp}$ – зависимость логарифма сигнала ОКТ от глубины хорошо аппроксимировалась прямой линией для обеих поляризаций зондирующего излучения (рис. А.4 в приложении А).

Полученные значения среднего показателя преломления $n_{t\perp}$ (значение n_t при ориентации плоскости поляризации перпендикулярно оси коллагенового пучка) образцов в начальном состоянии лежали в диапазоне от $\sim 1,402$ до $\sim 1,428$. Как показали оценки, вариация n_t от



Рисунок 4.6. ОКТ-изображения образца вторичного сухожильного пучка, полученные при ориентации плоскости преимущественной поляризации падающего излучения параллельно (а) и перпендикулярно (б) оси сухожильного пучка.

образца к образцу связана, главным образом, с различием в содержании воды в образцах. Содержание воды в образце в его исходном состоянии в значительной степени определяется деталями подготовки образца к измерениям. В наших экспериментах мы использовали два варианта установки образцов при исследовании их характеристик в нативном состоянии и состояниях, близких к нативным. В первом варианте исследуемый пучок слегка прижимался покровным стеклом (рис. 4.7(а)). Этот вариант установки использовался нами в случаях, когда наряду с ОКТ для контроля характеристик образцов использовалась поляризационная микроскопия, для выравнивания верхней поверхности образца, что облегчало интерпретацию результатов измерений. Во втором случае прокладки (спейсеры) между покровным и предметным стеклами обеспечивали наличие некоторого зазора между образцом и покровным стеклом, то есть покровное стекло не надавливало на образец (рис. 4.7(б)). Из-за сдавливания из образца выходит некоторое количество воды, что приводит к повышению его средних показателей преломления. Поэтому при первом варианте установки образцы в среднем имели немного большие средние показатели преломления, чем при втором варианте установки (приблизительно на 0,01). В экспериментах, описываемых в этой главе, использовался первый вариант установки, а в экспериментах, описываемых в главе 5 – второй. Данные, представленные на рисунке А.3 в приложении А, соответствуют первому варианту установки образца.

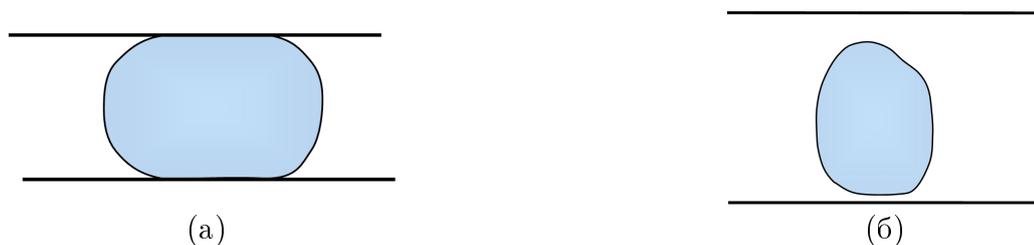


Рисунок 4.7. Варианты установки образца при проведении экспериментов.

4.1.5 Стандартный коэффициент изменения объема

В предварительных экспериментах, проведенных на достаточно большом количестве образцов ($n=12$) при установке образцов, как на рис. 4.7(а), было получена следующая оценка среднего значения n_t ($n_{t\perp}$) для образцов в исходном состоянии: $n_t = 1,423 \pm 0,003$ (среднее \pm стандартное отклонение). Значение $n_t = 1,423$, которое далее будет обозначаться n_{t0S} ($n_{t0S} = 1,423$), мы приняли в качестве опорного значения, соответствующего некоторому референтному уровню объемного содержания воды в ткани $c_w = c_{w0S}$ (по нашим оценкам $c_{w0S} = 0,677$, см. раздел 4.2).

Учитывая вариацию содержания воды в образцах в начальном состоянии, для характеристики изменения объема ткани наряду с параметром k_s мы использовали параметр, определяемый как

$$k_{ss} = \frac{V}{V_{0S}}, \quad (4.13)$$

где V_{0S} объем, который бы имел рассматриваемый сегмент образца в исходном состоянии, если бы объемное содержание воды в нем равнялось c_{w0S} , и рассчитываемый как

$$k_{ss} = \frac{S}{S_{0S}}, \quad (4.14)$$

где S_{0S} – значение площади сечения пучка при $c_w = c_{w0S}$. Значение S_{0S} рассчитывалось по экспериментальным значениям начальной площади сечения S_0 и начального значения n_t . Параметр k_{ss} был условно назван *стандартным коэффициентом изменения объема*.

С учетом того, что в нашем случае изменение содержания воды не изменяет длины образца, и того, что небольшие вариации доли воды около c_{w0S} связаны с изменением содержания только свободной воды в ткани (согласно литературным данным [216] такой режим реализуется при гидратации ткани, превышающей 0,45 г воды на грамм коллагена; для коллагеновых волокон в нативном состоянии гидратация всегда превышает 1 г/г), показатель преломления образца n_t при небольшом отклонении c_{w0} от c_{w0S} может быть с хорошей точностью выражен как

$$n_t = \frac{n_{t0S}S_{0S} + n_w(S - S_{0S})}{S}, \quad (4.15)$$

где n_w – групповой показатель преломления воды, откуда следует, что

$$S_{0S} = \frac{n_t - n_w}{n_{t0S} - n_w} S. \quad (4.16)$$

Это выражение и использовалось нами для расчета S_{0S} .

4.1.6 Способ оценки содержания воды в образце при его небольшом отклонении от референтного уровня

Приближение (4.15) предполагает следующую зависимость n_t от c_w :

$$n_t = n_{t0S} \frac{1 - c_w}{1 - c_{w0S}} + n_w \frac{c_w - c_{w0S}}{1 - c_{w0S}}. \quad (4.17)$$

Согласно (4.17)

$$c_w = \frac{(n_t - n_w) c_{w0S} + n_{t0S} - n_t}{n_{t0S} - n_w}. \quad (4.18)$$

С учетом сказанного выше очевидно, что это выражение может быть использовано для оценки c_w по измеренным значениям n_t при небольших отклонениях c_{w0} от c_{w0S} .

Уравнение (4.17) может быть записано в следующей форме:

$$n_t = (1 - c_w) n'_{dry} + n_w c_w, \quad (4.19)$$

где

$$n'_{dry} = \frac{n_{t0S} - n_w c_{w0S}}{1 - c_{w0S}}. \quad (4.20)$$

По смыслу n'_{dry} – это экстраполяционное значение среднего группового показателя преломления ткани в сухом состоянии. При $c_{w0S} = 0,677$ и $n_w = 1,341$ имеем $n'_{dry} = 1,594$. Уравнение (4.18) с использованием параметра n'_{dry} может быть преобразовано к следующему виду:

$$c_w = \frac{n'_{dry} - n_t}{n'_{dry} - n_w}. \quad (4.21)$$

В наших экспериментах значение объемного содержание воды в ткани c_w в момент измерения исходной площади сечения образца для разных образцов и экспериментальных ситуаций варьировалось в пределах от 0,644 до 0,76. Наименьшие значения c_w из этого диапазона были получены в ситуациях, когда образец был значительно деформирован при варианте установки образца, показанном на рис. 4.7(а). При вычислении опорного значения показателя преломления n_{t0S} данные, полученные для значительно деформированных образцов, не использовались.

4.2 Исследование зависимости средних групповых показателей преломления и двулучепреломления коллагеновых пучков от содержания воды в ткани. Калибровочный график для определения содержания воды в коллагенсодержащих тканях по значению их среднего группового показателя преломления

Основной целью серии экспериментов, результаты которых представляются в данном разделе, была оценка зависимости средних показателей преломления и двулучепреломления коллагеновых волокон от содержания воды в ткани, а одной из основных задач – построение калибровочной кривой, позволяющей оценивать содержание воды в ткани по измеренным значениям среднего группового показателя преломления образца, для широкого диапазона концентраций.

В данной серии образцы подвергались воздушному высушиванию, последующей регидратации, а также дегидратации в полиэтиленгликоле ПЭГ-300. В этой серии экспериментов объемная доля воды в ткани определялась по измеренным значениям k_s . По определению, объемная доля воды в ткани

$$c_w = \frac{V_w}{V}, \quad (4.22)$$

где V – объем ткани, а V_w – объем воды в ткани. В предположении, что с хорошей точностью

$$V = V_{\text{dry}} + V_w, \quad (4.23)$$

где V_{dry} – объем ткани в сухом состоянии, из (4.11) и (4.22) следует, что

$$c_w \approx \frac{k_s - k_{s\text{dry}}}{k_s}, \quad (4.24)$$

где $k_{s\text{dry}}$ – значение k_s для сухого состояния ткани. Для исходного состояния $c_w \approx 1 - k_{s\text{dry}}$. Начальное содержание воды в разных образцах несколько различается, поэтому значения $k_{s\text{dry}}$ для них будут тоже различаться. Непосредственный расчет c_w по формуле (4.24) потребовал бы экспериментального определения $k_{s\text{dry}}$ для исследуемого образца путем его обезвоживания (высушивания). Более удобной для практического определения c_w является следующая

формула:

$$c_w = \frac{k_{ss} - k_{ss\text{dry}}}{k_{ss}}, \quad (4.25)$$

где $k_{ss\text{dry}}$ – значение k_{ss} для сухого состояния ткани. Для образцов, отличающихся только начальным содержанием воды и размерами значения $k_{ss\text{dry}}$ должны быть одинаковыми, и очень близкими для образцов, не сильно отличающихся по составу компонентов, составляющих сухой вес (что характерно для образцов сухожильных пучков их хвоста зрелых крыс).

Величина $k_{ss\text{dry}}$ была оценена нами в экспериментах, в которых образцы подвергались высушиванию на воздухе. В качестве сухого состояния ткани нами рассматривалось состояние, которое достигается при выдерживании образца на воздухе при температуре 105°C до достижения постоянного объема (это один из стандартных вариантов определения сухого состояния биотканей). Благодаря малому диаметру образцов в нашем случае для достижения постоянного объема при такой сушке требовалось не более одного часа. Измерения с высушиванием ткани до такого стандартного сухого состояния были проведены для трех образцов. После воздушной сушки при комнатной температуре образцы выдерживались при температуре 105°C в течение часа. По результатам этого эксперимента была получена следующая оценка: $k_{ss\text{dry}} = 0,323 \pm 0,003$. Исходя из этого, объемная доля воды в ткани при $n_t = n_{t0S}$ была оценена нами как $c_{w0S} = 0,677 \pm 0,003$ ($c_{w0S} = 1 - k_{ss\text{dry}}$). Если принять приведенную плотность сухой компоненты ткани (отношение плотности этой компоненты к плотности воды), ρ_{dry} , равной 1,34 [29], массовое содержание воды в ткани в состоянии с $c_w = c_{w0S}$ ($n_t = n_{t0S}$) можно оценить как $61,0 \pm 0,3\%$. По литературным данным для нативных сухожилий массовое содержание воды составляет 55–70% [50].

Для оценки зависимости среднего группового показателя преломления ткани n_t от содержания воды c_w была проведена серия экспериментов по дегидратации и последующей регидратации образцов.

На рисунке А.5 в приложении А в качестве примера показаны измеренные зависимости коэффициента изменения объема k_s и среднего группового показателя преломления ткани n_t от времени при воздушном высушивании для одного из образцов коллагеновых пучков. Из этого рисунка хорошо видно, что сокращение объема ткани из-за потери воды сопровождается увеличением ее среднего показателя преломления.

На рисунке 4.8 показаны измеренные зависимости показателя преломления n_t от стандартного коэффициента изменения объема k_{ss} для четырех образцов вторичных сухожильных коллагеновых пучков хвоста крысы, образцов 1, 2, 3 и 4. Для образца 1 ОКТ-мониторинг осуществлялся в течение 30 минут при сушке образца при комнатной температуре. Образец 2

высушивался при комнатной температуре в течение 2 часов, после этого выдерживался 1 час при 50°C и затем еще один час при 105°C . Образец 3 высушивался 40 минут при комнатной температуре и затем 1 час при 105°C . Образец 4 был сначала высушен в течение 20 минут при комнатной температуре, затем был помещен в физиологический раствор для регидратации. Как видно из рисунка 4.8, данные полученные для разных образцов хорошо согласуются между собой, также как и данные полученные при дегидратации и регидратации образца 4.

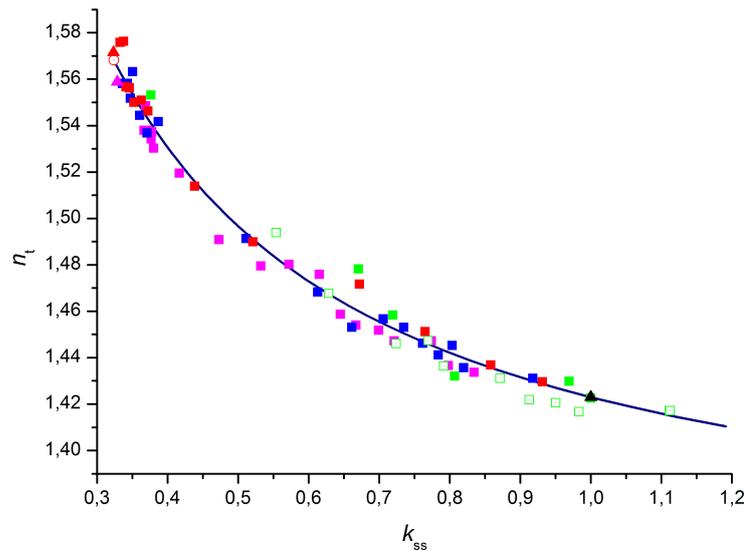


Рисунок 4.8. Зависимость показателя преломления коллагеновых пучков n_t от коэффициента изменения объема k_{ss} . Синими квадратиками показаны экспериментальные точки (k_{ss} , n_t) для образца 1 (высушивание в воздухе при комнатной температуре).

Красными символами представлены данные для образца 2: квадратиками – точки, полученные в процессе высушивания образца в воздухе при комнатной температуре; незакрашенным кружком и треугольником показаны точки, полученные при воздушном высушивании образца при 50°C и 105°C , соответственно. Сиреневыми символами показаны данные для образца 3: квадратиками соответствуют воздушному высушиванию при комнатной температуре, треугольником – воздушному высушиванию при 105°C . Зелеными символами представлены данные для образца 4: закрашенные квадратиками соответствуют стадии воздушного высушивания, а незакрашенные квадратиками – стадии регидратации (80 мин). Черным треугольником показано значение n_{t05} .

На рисунке 4.9 показаны полученные экспериментальные зависимости показателя преломления n_t от объемного содержания воды в ткани c_w . Значения c_w рассчитывались по формуле (4.25) при $k_{ss\text{dry}} = 0,323$. Для сравнения на этом же рисунке представлены литературные экспериментальные данные, полученные при дегидратации роговицы [208]. В работе [208] представлена экспериментальная зависимость среднего группового показателя преломления роговицы коровы при $\lambda_0 = 819,9$ нм от массового коэффициента гидратации

ткани, H . Массовый коэффициент гидратации ткани H определяется как отношение массы воды в ткани к массе ткани в сухом состоянии. Рассчитав значения c_w по H по формуле

$$c_w = \frac{H\rho_{\text{dry}}}{1 + H\rho_{\text{dry}}} \quad (4.26)$$

при $\rho_{\text{dry}} = 1,34$ для экспериментальных точек работы [208], мы получили соответствующие им точки (c_w, n_t) , которые и представлены на рис. 4.9 для сравнения. Как видно из этого рисунка, наши данные для сухожильных пучков очень хорошо состыкуются с данными [208] для роговицы.

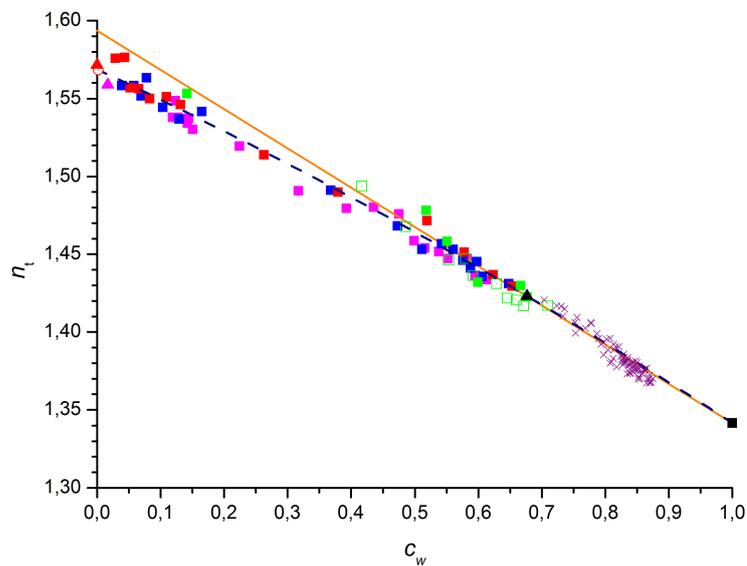


Рисунок 4.9. Зависимость показателя преломления коллагеновых пучков n_t от объемного содержания воды c_w . Данные, полученные для образцов 1-4, показаны такими же символами, как и на предыдущем рисунке. Крестиками показаны экспериментальные точки, рассчитанные по литературным данным [208] для роговицы глаза.

Полученные экспериментальные данные для коллагеновых пучков хорошо аппроксимируются квадратичной функцией

$$n_t = 1,5713 - 0,1969c_w - 0,0328c_w^2, \quad (4.27)$$

она показана пунктирной линией на рис. 4.9. Коэффициенты этого полинома были найдены методом наименьших квадратов при дополнительных условиях, что $n_t(c_w = 1) = n_w$ при $c_w = 1$, а $n_t(c_{w0S}) = n_{t0S}$ ($c_{w0S} = 0,677$, $n_{t0S} = 1,423$, $n_w = 1,3416$). При $c_w = 0$ выражение (4.27) дает $n_t = 1,5713$. Это значение близко к полученным в эксперименте значениям пока-

зателя преломления ткани в сухом состоянии, n_{dry} . При использовании аппроксимации (4.27) среднеквадратичная невязка, σ_{fit} , для представленного набора экспериментальных данных составила $5,4 \cdot 10^{-3}$. При аппроксимации экспериментальных данных линейной функцией вида

$$n_t = (1 - c_w) n''_{\text{dry}} + n_w c_w, \quad (4.28)$$

соответствующей правилу смешения Гладстона-Даля (как и (4.19)) [6, 29, 217], при заданном $n_w = 1,3416$, невязка σ_{fit} оказалась минимальной ($6,7 \cdot 10^{-3}$) при $n''_{\text{dry}} = 1,576$. Эта аппроксимация представляется неудовлетворительной из-за того, что она дает существенно заниженные значения для области естественной гидратации. Так, например, для $c_w = c_{w0S}$ она дает значение $n_t = 1,417$. Аппроксимация полученных данных прямой, проходящей через точки $(c_w, n_t) = (1, 1,3416)$ (вода) и $(c_w, n_t) = (c_{w0S}, n_{t0S})$, которая описывается уравнением (4.19) и показана оранжевой линией на рис. 4.9, дает хорошую точность в области $0,52 \leq c_w \leq 1$ ($\sigma_{\text{fit}} = 4 \cdot 10^{-3}$), однако дает завышенные, если ориентироваться на представленный набор экспериментальных точек, полученных при воздушном высушивании образцов, значения для области меньших c_w . Напомним, что для сухого состояния уравнение (4.19) дает $n_t = 1,594$, тогда как экспериментальные значения $n_{\text{dry}} \equiv n_t(c_w = 0)$, полученные при воздушной сушке составляли порядка 1,571.

В качестве одной из возможных причин существенного отклонения экспериментально полученной кривой $n_t(c_w)$ от прямой (4.19) в области $c_w \leq 0,52$ мы рассматривали изменение режима гидратации ткани. В литературе различают два режима гидратации коллагеновых волокон [218–221]. При относительно больших значениях параметра гидратации H ($H > H_c$, где H_c – некоторое критическое значение, так называемая точка фибриллярного насыщения [220]), изменение содержания воды в ткани приводит к изменению содержания воды в межфибрилярном пространстве, тогда как содержание воды в коллагеновых фибриллах остается неизменным [208, 218–220]. В альтернативном режиме ($H < H_c$) изменения в содержании воды в ткани сопровождаются изменением содержания воды, как в фибриллах, так и в межфибрилярном пространстве [218–220]. Для сухожилий $H_c \approx 0,82$ [219, 220], что соответствует $c_w \approx 0,52$. Выход сильно связанной воды из ткани во втором режиме мог быть причиной указанного отклонения.

В качестве другой вероятной причины указанного отклонения мы рассматривали образование в ткани пор, заполняемых воздухом, при ее воздушной сушке. Поскольку показатель преломления воздуха намного меньше показателей преломления составляющих ткани, образование воздушных пор должно приводить к понижению среднего показателя преломления

ткани. Факт образования в ткани пор при воздушной сушке отмечался в литературе [220]. Для того чтобы оценить, насколько существенным является этот фактор в нашем случае, мы провели серию экспериментов по дегидратации коллагеновых пучков в полиэтиленгликоле, тем самым исключая возможность образования в ткани воздушных пор. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) нередко используется в качестве иммерсионного агента для оптического просветления тканей. Это вещество имеет очень длинные молекулы, не способные быстро диффундировать в ткань, поэтому при относительно коротком контакте с тканью, например, в течение часа, действие полиэтиленгликоля и его концентрированных водных растворов на ткань состоит лишь в ее обезвоживании, что часто используется в биофизических исследованиях. В наших экспериментах использовались водные растворы полиэтиленгликоля ПЭГ-300 с объемным содержанием ПЭГ 48%, 87% и 91%. Эксперименты были проведены на 10 образцах сухожильных пучков. Полученные экспериментальные точки (c_w, n_t) показаны на рисунке 4.10. Также, для сравнения на этом рисунке показана прямая (4.19) и кривая воздушной сушки (4.27). Как видно из рисунка, в области $c_w \leq 0,52$ точки, полученные при дегидратации в ПЭГ, находятся выше аппроксимационной кривой воздушной сушки (4.27) и с хорошей точностью ложатся на прямую (4.19). Это, с одной стороны, свидетельствует о том, что основной причиной существенной нелинейности зависимости n_t от c_w , полученной при воздушном высушивании, является образование воздушных пор. С другой стороны, это дает основание для использования формул (4.19) и (4.21) для более широкого диапазона значений c_w , когда речь идет об иммерсионном дегидратировании. Судя по данным, представленным на рисунке 4.10, это, по меньшей мере, диапазон от 0,2 до 0,85. И, по меньшей мере, этот диапазон может считаться диапазоном применимости к коллагеновым тканям правила Гладстона-Даля, предполагающего линейную зависимость показателя преломления ткани от объемного содержания воды. Хорошее соответствие данных для сухожилий и роговицы, тканей, очень сильно отличающихся друг от друга, как по морфологии, так и по содержанию воды в естественном состоянии, указывает на возможность использования формул (4.19) и (4.21) и для других коллагенсодержащих тканей, таких склера.

На рисунке 4.11 представлены полученные в ходе описанных экспериментов значения среднего группового показателя двулучепреломления ткани Δn_t при разных уровнях гидратации ткани. Содержание воды в ткани на данном рисунке характеризуется с помощью коэффициента объемной гидратации ткани H_V , определяемого как отношение объема воды

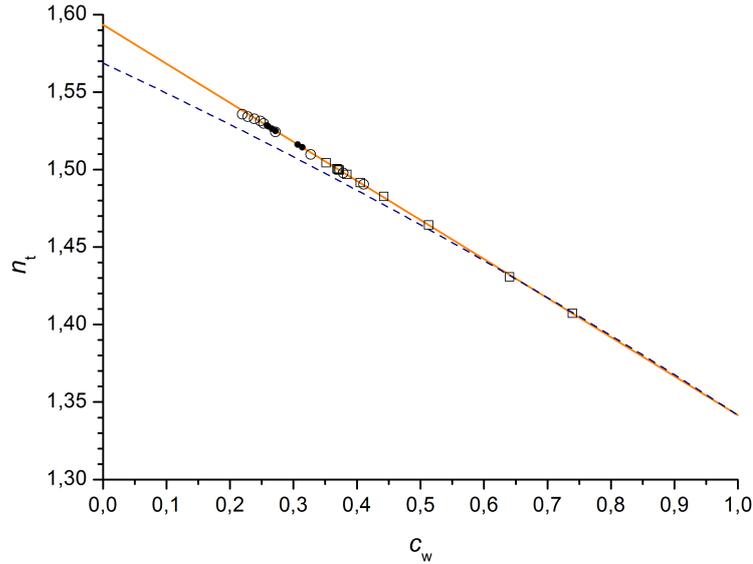


Рисунок 4.10. Точки (c_w, n_t) , полученные при дегидратации образцов в водных растворах ПЭГ. Незакрашенными квадратиками представлены данные для образца, дегидратируемого в растворе с объемным содержанием ПЭГ 48%; точки соответствуют разным моментам времени с момента погружения образца в раствор ПЭГ в течение первых 14 минут. Незакрашенными кружками показаны данные для образца, дегидратируемого в растворе с объемным содержанием ПЭГ 91%, полученные в течение 40 минут с момента погружения. Закрашенными кружками показаны экспериментальные точки для восьми разных образцов, дегидратировавшихся в растворе с объемным содержанием ПЭГ 87%, полученные через 10-15 минут с момента погружения. Сплошной линией показана прямая (4.19), пунктирной – кривая (4.27).

в ткани к объему ткани в сухом состоянии:

$$H_V = \frac{V_w}{V_{\text{dry}}}. \quad (4.29)$$

Экспериментальные значения H_V рассчитывались по формуле:

$$H_V = \frac{c_w}{1 - c_w}. \quad (4.30)$$

Обращает на себя внимания немонотонный характер изменения Δn_t как функции H_V : при уменьшении Δn_t от нативного состояния Δn_t сначала уменьшается, затем, достигнув минимума при H_V порядка 0,4-0,6, начинает увеличиваться, достигая в сухом состоянии, значений превышающих начальное значение. Такой характер изменения Δn_t при дегидратации ткани хорошо объясняется в рамках теоретической модели, представленной в разделе 4.4.

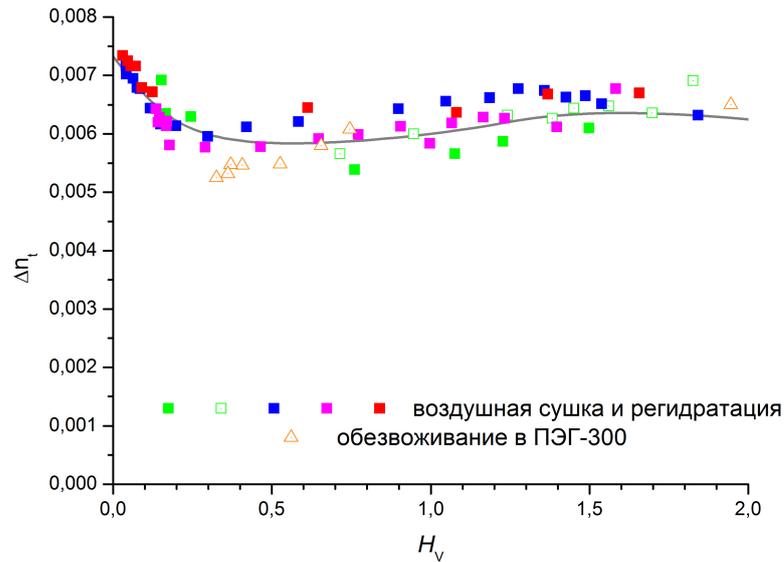


Рисунок 4.11. Зависимость среднего группового показателя двулучепреломления коллагеновых пучков от содержания воды. Обозначения для точек, полученных при воздушной дегидратации и регидратации образцов, такие же, как на рисунке 4.8. Треугольниками показаны точки, полученные при дегидратации одного из образцов в 91% растворе ПЭГ-300.

4.3 Результаты, полученные при иммерсионном просветлении образцов

При проведении экспериментов, представляемых в настоящем разделе, преследовалась цель изучить воздействие на коллагеновые пучки иммерсионных агентов как в контексте применения техники иммерсионного просветления при фотосшивании ткани, так и в контексте применения этой техники при поляризационном картографировании.

4.3.1 Иммерсионные агенты

В качестве иммерсионных агентов в данной серии экспериментов нами использовались водные растворы глицерина с объемным содержанием глицерина 82,3%, 58,1%, 41,2% и 20,6%, водный раствор пропиленгликоля объемной концентрацией 89%, водный раствор глюкозы с массовым содержанием глюкозы 40%, Омнипак-300 и водный раствор полиэтиленгликоля ПЭГ-300 с объемным содержанием ПЭГ 91%.

Фазовые показатели преломления иммерсионных агентов были измерены Е.Н. Лазаревой с помощью многоволнового рефрактометра Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония): источни-

ком излучения служила лампа накаливания высокой мощности; для спектральной селекции использовались узкополосные интерференционные фильтры с максимумом пропускания на длинах волн 480, 486, 546, 589, 644, 656, 680, 930, 1100, 1300 и 1500 нм. Полученные данные по фазовым показателям для некоторых иммерсионных агентов представлены на рисунке А.6 в приложении А. Рассчитанные значения групповых показателей преломления иммерсионных агентов представлены в таблице А.2 в приложении А.

4.3.2 Данные по изменению объема и среднего группового показателя преломления ткани при иммерсионном просветлении

На рисунках 4.12 и 4.13 показаны типичные кинетические кривые для коэффициентов изменения объема k_s , k_{ss} и среднего группового показателя преломления n_t для $\lambda_0 = 930$ нм при просветлении образцов в различных иммерсионных жидкостях (планки погрешностей показывают 90% доверительный интервал). Значения параметров, соответствующие начальному состоянию, были получены при измерении параметров образца, находящегося в физиологическом растворе, непосредственно перед процедурой иммерсионного просветления.

Во всех рассматриваемых случаях можно условно разделить процесс взаимодействия ткани с иммерсионной жидкостью на две основные стадии. Первая стадия, начальная, – это стадия быстрой дегидратации, на которой доминирующую роль играет обезвоживание ткани за счет осмотического действия иммерсионного агента. На этой стадии происходит уменьшение объема ткани за счет выхода из нее воды. Вторая стадия – это стадия набухания ткани. Доминирующую роль на этой стадии играет диффузия иммерсионного агента в ткань. Исходя из этого, можно считать моментом окончания первой стадии момент времени (t_{DH}), в который ткань приобретает наименьший объем. В этот момент времени коэффициенты k_s и k_{ss} имеют свое наименьшее значение, что позволяет легко определить t_{DH} по измеренным временным зависимостям k_s и k_{ss} .

В рассматриваемых примерах t_{DH} составило $\sim 14,6$ мин для раствора пропиленгликоля, $\sim 10,4$ мин для Омнипак, $\sim 5,5$ мин для раствора глюкозы, $\sim 3,2$ мин для 20,6% и 41,2% растворов глицерина, $\sim 5,2$ мин для 58,1% раствора глицерина и $\sim 8,2$ мин для 82,3% раствора глицерина. В случае раствора ПЭГ t_{DH} составило около 9 мин, при этом объем ткани практически не изменялся на протяжении последующих 50-60 минут, что объясняется крайне медленной диффузией полиэтиленгликоля в ткань. После длительного выдерживания образца в растворе ПЭГ, как видно из представленных данных, набухание ткани стало заметным. По

полученным кривым для k_s и k_{ss} можно оценить скорость диффузии иммерсионного агента в ткань на стадии набухания и для других иммерсионных агентов.

Данные для трех образцов, просветлявшихся в 82,3% растворе глицерина, представленные в таблице A.3 в приложении A, позволяют оценить степень разброса результатов, полученных для разных образцов в одном и том же иммерсионном агенте. Средний диаметр образца в исходном состоянии, d_0 , значения которого указаны в таблице A.3, рассчитывался по формуле $d_0 = 2\sqrt{S_0/\pi}$. Можно заметить, что, несмотря на существенную разницу в начальном содержании воды в образцах, о чем можно судить по начальным значениям n_t , значения t_{DH} и значения $k_{ss}(t)$ и $n_t(t)$ при $t \geq t_{DH}$ оказались близкими для разных образцов. То же наблюдалось и для других иммерсионных агентов.

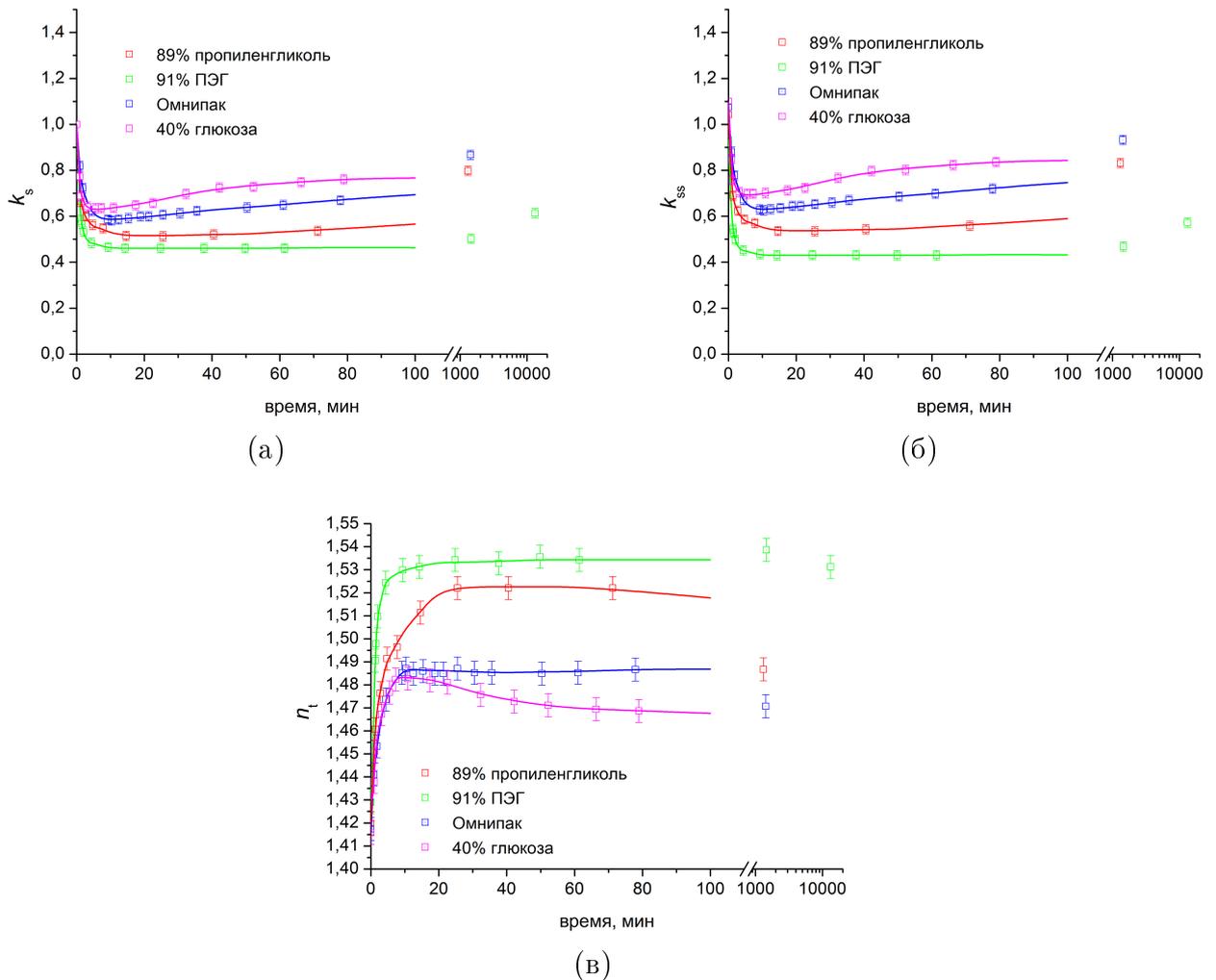


Рисунок 4.12. Типичные временные зависимости коэффициентов изменения объема k_s (а), k_{ss} (б) и среднего группового показателя преломления n_t (в) сухожильных пучков при их оптическом просветлении в 89% растворе пропиленгликоля, 91% растворе ПЭГ, Омнипак-300, 40% растворе глюкозы.

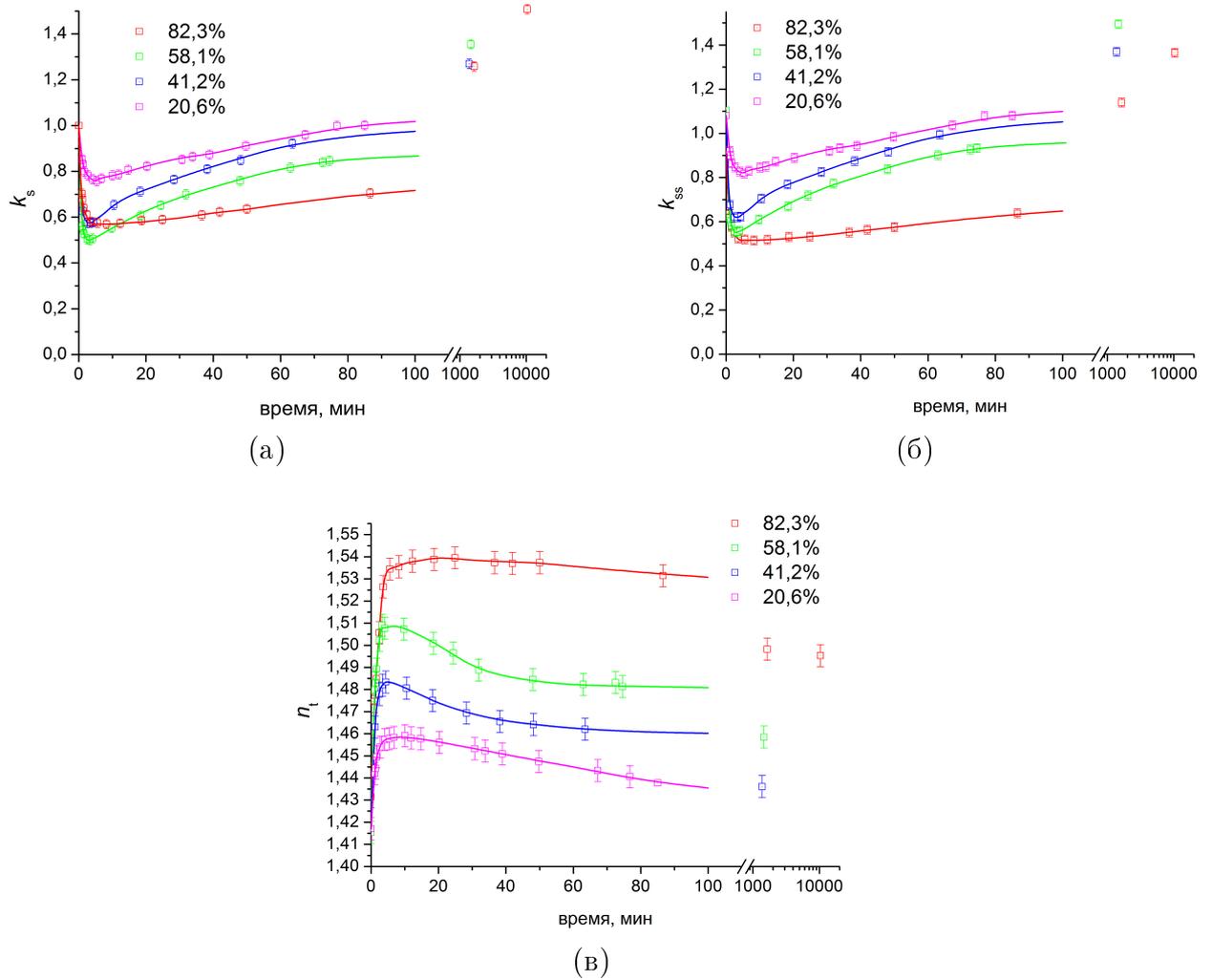


Рисунок 4.13. Типичные временные зависимости коэффициентов изменения объема k_s (а), k_{ss} (б) и среднего группового показателя преломления n_t (в) сухожильных пучков при их оптическом просветлении в водных растворах глицерина с разной концентрацией (82,3%, 58,1%, 41,2% и 20,6%).

Из сопоставления данных для k_s и n_t , представленных на рисунках 4.12 и 4.13, видно, что на стадии дегидратации средний показатель преломления ткани резко увеличивается – в ткани понижается содержание компонента с наименьшим показателем преломления (воды). Можно обратить внимание, что для всех рассматриваемых иммерсионных агентов в момент достижения наименьшего объема средний показатель преломления ткани n_t оказался выше, чем показатель преломления иммерсионной жидкости n_0 . Поэтому, если на следующей стадии выхода воды из ткани не происходит, диффузия иммерсионного агента в ткань должна приводить к понижению n_t . Если же вода из ткани на этой стадии продолжает выходить, может оказаться существенной тенденция к повышению n_t за счет замещения воды в ткани иммерсионным агентом. Как видно из сравнения данных на рис. 4.12 (а) и (в), эта тенденция играла определяющую роль при просветлении в Омнипак – в течение, по меньшей мере, часа

набухания в этом ИА показатель преломления образца n_t не уменьшался, тогда, как объем ткани за это время заметно увеличился. При просветлении в растворах глицерина, растворе пропиленгликоля и растворе глюкозы увеличение объема образца на стадии набухания сопровождалось уменьшением n_t . В этих случаях, по всей видимости, выхода воды из ткани на стадии набухания не происходит совсем или он является столь малым, что тенденция к понижению показателя преломления ткани за счет диффузии иммерсионного агента в ткань преобладает над тенденцией к его повышению за счет выхода воды.

Рисунок 4.14 дает представление о характере и степени неоднородности показателя преломления образцов на разных стадиях иммерсионного просветления. Представленные данные получены для образца Р1 (см. раздел 4.1.1), просветлявшегося в растворе пропиленгликоля. Можно видеть, что в течение первых пяти минут после погружения образца в иммерсионную жидкость значение показателя преломления минимально в центре сухожильного пучка и увеличивается к границам образца, что свидетельствует о большей степени дегидратации ткани вблизи границ. К концу стадии дегидратации неоднородность показателя преломления внутри образца почти исчезает. На стадии набухания долгое время значения показателя преломления ткани вблизи границ оказываются меньше их значений в центре пучка, что отражает картину диффузии иммерсионного агента в ткань.

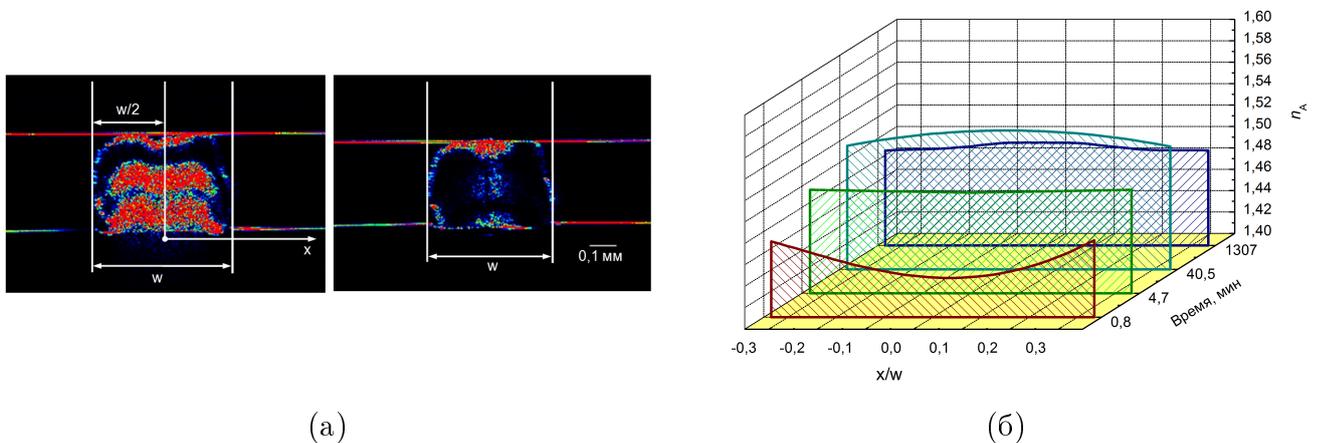


Рисунок 4.14. (а) ОКТ-сканы образца Р1, просветляемого в растворе пропиленгликоля, и используемая система координат (w – ширина коллагенового пучка). (б) Пространственные зависимости показателя преломления n_A образца в разные моменты времени после его погружения в иммерсионную жидкость.

Степень проявления диффузии иммерсионного агента на этапе дегидратации может быть оценена посредством сравнения траектории движения точки состояния образца (кривой эволюции) в пространстве (k_{ss}, n_t) в заданных условиях просветления с кривыми эволюции, соответствующими чистой дегидратации или регидратации аналогичных образцов (рис. 4.15).

Данные для последних были получены нами в экспериментах по воздушной дегидратации образцов с последующей регидратацией в физрастворе, а также дегидратации в растворе полиэтиленгликоля (см. раздел 4.2). На рис. 4.15 заштрихован коридор значений (k_{ss}, n_t) , которые были получены при воздушном высушивании и регидратации образцов. Штрихпунктирная линия на рис. 4.15 соответствует линейной зависимости показателя преломления ткани от объемного содержания воды, выражаемой формулой (4.19). С учетом результатов, представленных в разделе 4.2, мы использовали эту линию в качестве эталонной кривой дегидратации-регидратации. Для образцов, подвергнутых иммерсионному просветлению, незакрашенные символы на рис. 4.15 показывают экспериментальные точки, полученные в течение 60-85 минут нахождения образца в иммерсионном агенте, а покрашенные символы представляют данные, полученные более чем через 21 час после погружения образца в иммерсионный агент. Экспериментальные точки, соответствующие начальным состояниям, отмечены крестиками. Из рисунка 4.15 видно, что на начальной стадии просветления кривые эволюции всех просветляемых образцов идут вблизи эталонной кривой дегидратации-регидратации, в пределах коридора значений, полученных при дегидратации. Затем эти кривые выходят за пределы указанного коридора в область больших значений n_t , что является очевидным признаком диффузии иммерсионного агента в ткань: показатели преломления иммерсионных агентов выше показателя преломления воды, поэтому замена в ткани некоторого количества воды на иммерсионный агент при сохранении объема ткани должна приводить к увеличению ее среднего показателя преломления. Можно заметить, что в случаях просветления в растворах пропиленгликоля, глицерина и глюкозы, точки состояния, соответствующие моментам времени, в которые объем ткани является наименьшим, лежат значительно выше эталонной кривой дегидратации-регидратации, что свидетельствует о том, что к окончанию стадии дегидратации в ткани уже находится значительное количество иммерсионного агента. Используя закон Гладстона-Даля [217], по экспериментальным значениям k_{ss} и n_t можно оценить содержание воды и иммерсионного агента в ткани в момент достижения ею минимального объема. Полученные данные для некоторых образцов представлены в Таблице 4.1. Использованный нами способ оценки содержания воды и иммерсионного агента по данным для k_{ss} и n_t представлен в разделе 4.3.4.

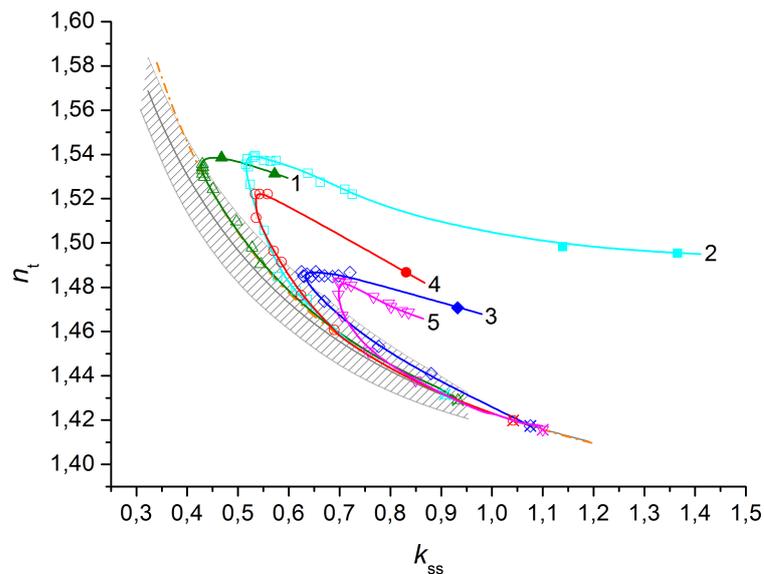


Рисунок 4.15. Траектории движения точек состояния (k_{ss}, n_t) при иммерсионном просветлении коллагеновых пучков в различных иммерсионных агентах: 1 – 91% раствор ПЭГ-300, 2 – 82,3% раствор глицерина, 3 – Омнипак-300, 4 – 89% раствор пропиленгликоля, 5 – 40% раствор глюкозы.

Таблица 4.1. Объемное содержание воды и иммерсионного агента в сухожильных пучках в момент достижения минимального объема

Иммерсионный агент	t_{DH} , мин	Объемное содержание воды	Объемное содержание иммерсионного агента
82,3% раствор глицерина	$8,2 \pm 3,5$	$0,070 \pm 0,006$	$0,304 \pm 0,046$
Омнипак-300	$10,4 \pm 3,0$	$0,345 \pm 0,023$	$0,139 \pm 0,039$
89% раствор пропиленгликоля	$14,6 \pm 2,5$	$0,197 \pm 0,003$	$0,201 \pm 0,063$
40% раствор глюкозы	$5,5 \pm 2,0$	$0,219 \pm 0,004$	$0,318 \pm 0,067$

4.3.3 Данные по изменению средних показателей двулучепреломления ткани при иммерсионном просветлении

Для контроля состояния и характеристики образцов в ходе измерений наряду с описанной выше методикой ОКТ-мониторинга, нами использовалась поляризационная микроскопия. Количественные поляризационные измерения, а именно, поляризационное картографирование и оценка двулучепреломления ткани с помощью компенсатора Бабине (она становится возможной, когда под действием иммерсионного агента поляризационная зависимость потерь при прохождении света через образец становится слабой [205]), осуществлялись нами, главным образом, в условиях, когда свойства образца под действием иммерсионного агента изменялись медленно, как правило, не раньше, чем через час после начала иммерсионного просветления, для того чтобы можно было не учитывать изменение свойств образца во время измерений и в промежуток времени между данным измерением и измерением геометрии образца с помощью ОКТ. Текущие значения геометрических параметров образца требовались для оценки коэффициента двулучепреломления ткани по значениям фазовой задержки, получаемым посредством поляризационного картографирования или с помощью компенсатора Бабине. Пособием поляризационного картографирования, с использованием методик описанных в работах [202, 205], нами контролировалась степень однородности ориентации коллагеновых волокон в образцах и оценивался фазовый показатель двулучепреломления на длинах волн видимого диапазона. Для измерений нами была использована система поляризационного картографирования, описанная в приложении Б. С помощью компенсатора Бабине оценивалась величина фазового показателя двулучепреломления ткани на длине волны 589 нм.

На рисунке 4.16 показаны полученные посредством ОКТ-мониторинга зависимости среднего группового показателя двулучепреломления Δn_t коллагеновых пучков от времени при иммерсионном просветлении образцов в водных растворах глицерина разной концентрации, 89% водном растворе пропиленгликоля, 40% растворе глюкозы и Омнипак-300. Как видно из этого рисунка, на начальной стадии взаимодействия иммерсионного агента с тканью происходит быстрое уменьшение коэффициента двулучепреломления до уровня, зависящего от используемого иммерсионного агента. После этого коэффициент двулучепреломления продолжает уменьшаться, но с все меньшей и меньшей скоростью. Наиболее сильное изменение Δn_t было в случаях, когда в качестве иммерсионного агента использовались растворы глицерина большой концентрации (рис. 4.16), наименьшим – в случае ПЭГ (рис. 4.11) и Омнипак.

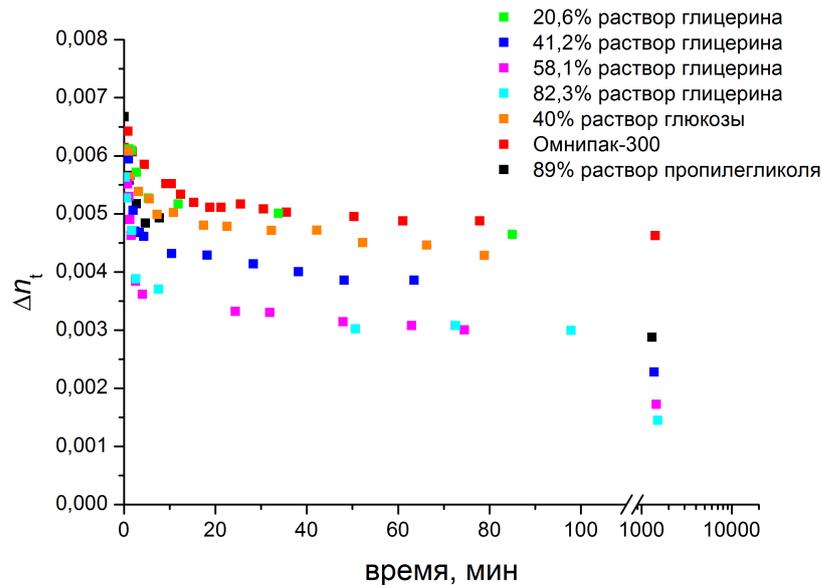


Рисунок 4.16. Изменение среднего группового показателя двулучепреломления коллагеновых пучков при выдерживании их в различных иммерсионных агентах.

На рисунке 4.17 показаны измеренные с помощью компенсатора Бабине с ОКТ-контролем размера образца значения фазового показателя преломления для четырех образцов коллагеновых пучков, выдерживавшихся в 82,3% растворе глицерина от 4 до 15 дней. Из этого рисунка видно, что даже после нескольких дней выдерживания образцов в данном иммерсионном агенте уменьшение коэффициента двулучепреломления продолжалось, но было очень медленным. В целом оценки двулучепреломления, полученные для видимой области с помощью компенсатора Бабине и поляризационного картографирования, хорошо согласовались с оценками, полученными с помощью ОКТ для $\lambda=930$ нм, с учетом дисперсии показателей преломления и разницы между фазовым и групповым показателями преломления.

4.3.4 Количественная оценка содержания воды и иммерсионного агента в ткани в процессе иммерсионного просветления

Рассматривая ткань с проникшим в нее иммерсионным агентом как трехкомпонентную систему, состоящую из "сухой" составляющей ткани, воды и иммерсионного агента (или его неводной составляющей), и предполагая аддитивность объемов этих трех компонентов, а также применимость к этой системе правила Гладстона-Даля, можно выразить значения коэффициента k_s и показателя преломления n_t в любой заданный момент времени следующим

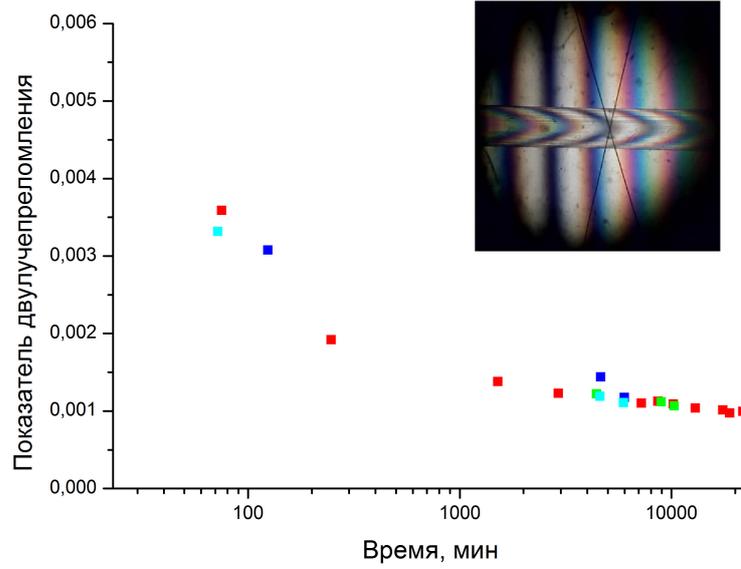


Рисунок 4.17. Значения эффективного фазового показателя двулучепреломления ткани, полученные при помощи компенсатора Бабине ($\lambda = 589$ нм) для четырех образцов вторичных коллагеновых пучков в процессе их оптического просветления в 82,3% водном растворе глицерина. По оси абсцисс отложено время с момента погружения образца в иммерсионную жидкость. На вставке показано типичное изображение просветленного коллагенового пучка в компенсаторе Бабине.

образом:

$$k_s = \frac{V_{\text{dry}} + V_w + V_{\text{oca}}}{V_{\text{dry}} + V_{w0}}, n_t = \frac{n_{\text{dry}}V_{\text{dry}} + n_wV_w + n_{\text{oca}}V_{\text{oca}}}{V_{\text{dry}} + V_w + V_{\text{oca}}}, \quad (4.31)$$

где V_{dry} , как и прежде, объем "сухой" составляющей ткани, V_w – объем воды в ткани в заданный момент времени, V_{w0} – объем воды в ткани в начальный момент времени, V_{oca} – объем иммерсионного агента в ткани (или его неводной составляющей), n_{oca} – групповой показатель преломления иммерсионного агента (или его неводной составляющей) или его соответствующее экстраполяционное значение.

С учетом результатов, представленных в предыдущем разделе, показатель преломления сухой ткани n_{dry} целесообразно взять равным n'_{dry} (см.(4.19)). Разделив числители и знаменатели в выражениях (4.31) на V_{dry} , получаем следующую систему уравнений:

$$k_s = \frac{1 + \gamma_w + \gamma_{\text{oca}}}{1 + \gamma_{w0}}, \quad (4.32)$$

$$n_t = \frac{n_{\text{dry}} + n_w\gamma_w + n_{\text{oca}}\gamma_{\text{oca}}}{1 + \gamma_w + \gamma_{\text{oca}}}, \quad (4.33)$$

где

$$\gamma_w = \frac{V_w}{V_{dry}} \quad (4.34)$$

– удельное содержание воды в ткани, γ_{w0} – удельное содержание воды в ткани в исходном состоянии, и

$$\gamma_{oca} = \frac{V_{oca}}{V_{dry}} \quad (4.35)$$

– удельное содержание иммерсионного агента (или его неводной составляющей) в ткани. Параметр γ_{w0} равен степени объемной гидратации ткани в начальном состоянии и может быть рассчитан по найденному для начального состояния значению удельного содержания воды c_{w0} по формуле

$$\gamma_{w0} = \frac{c_{w0}}{1 - c_{w0}} \quad (4.36)$$

(см. (4.30)). Поэтому при известных значениях показателей преломления система (4.32)-(4.34) содержит только два неизвестных, γ_w и γ_{oca} . Решение этой системы относительно γ_w и γ_{oca} дает следующие расчетные выражения для этих параметров:

$$\gamma_w = \frac{1}{n_{oca} - n_w} \left[\frac{k_s}{1 - c_{w0}} (n_{oca} - n_t) + n_{dry} - n_{oca} \right], \quad (4.37)$$

$$\gamma_{oca} = \frac{1}{n_{oca} - n_w} \left[\frac{k_s}{1 - c_{w0}} (n_t - n_w) + n_w - n_{dry} \right] \quad (4.38)$$

С помощью этих выражений нами рассчитывались временные зависимости γ_w и γ_{oca} , характеризующие процесс иммерсионного просветления.

На рис. 4.18-4.23 представлены несколько примеров. На рис. 4.18 и 4.19 представлены результаты мониторинга – полученные экспериментальные зависимости k_s и n_t от времени (рис. 4.18) – и рассчитанные по ним временные зависимости γ_w и γ_{oca} для двух образцов коллагеновых пучков, образцов G1 и G2, с существенно разным содержанием воды в начальном состоянии, просветлявшихся в 82,3% растворе глицерина. Начальное содержание воды в образце G1 составляло около 64,4%, в образце G2 – около 68,8%. В данном случае γ_{oca} имеет смысл удельного содержания глицерина в ткани. Как видно из полученных кривых, на начальном этапе происходит быстрый выход из ткани очень большой части воды. В то же время, как видно из рисунка 4.19 (б) на этом этапе в ткань попадает значительное количество глицерина, вещества с большим показателем преломления (объемом порядка 0,3-0,4 относительно "сухого" объема). Именно этим можно объяснить тот факт, что к окончанию этапа быстрой дегидратации ткани, показатель двулучепреломления ткани оказался существенно ниже, чем в случае дегидратации образцов в воздухе или в ПЭГ (ср. данные на рис. 4.11

и 4.16). По мере выхода воды из ткани резко уменьшается скорость диффузии глицерина в ткань – факт уменьшения скорости диффузии с уменьшением содержания воды в ткани отмечался в литературе [134]. После этапа быстрой дегидратации наступает стадия медленной диффузии иммерсионного агента в ткань, происходит медленное набухание ткани. Можно обратить внимание на то, что уровень минимальных значений γ_w оказался одинаковым для обоих образцов, что дает основание утверждать, что этот уровень определяется, главным образом, содержанием воды в иммерсионном агенте. То же можно сказать о значениях $\gamma_{оса}$, Δn_t , достигаемых через сутки. Для образца G1 Δn_t составило около $1,6 \cdot 10^{-3}$, для образца G2 – около $1,5 \cdot 10^{-3}$. Это свидетельствует о том, что достигнутое через сутки состояние ткани, по содержанию в ней воды и иммерсионного агента, оказалось почти одинаковым для обоих образцов. Данные, представленные на рис. 4.17, позволяют говорить о том, что и при более длительном хранении образцов в иммерсионной жидкости их состав изменялся приблизительно одинаковым образом. Достижение одинаковых по составу ткани состояний образцов при иммерсионном просветлении является крайне желательным с точки зрения поляризационного картографирования, и наличие простых и надежных рецептов достижения таких состояний существенно расширило бы его возможности. В связи с этим данный результат представляется очень полезным. Также обращает на себя внимание тот факт, что через сутки просветления значение k_s для обоих образцов стало близким к 1 (рис. 4.18(а)), то есть размер образцов стал приблизительно таким же, как в нативном состоянии. Далее образцы продолжали набухать. Осуществление картографирования в условиях, когда размеры образца оказываются близкими к нативным, является более предпочтительным. Рассматриваемая методика позволяет найти оптимальное, с этой точки зрения, время картографирования образца.

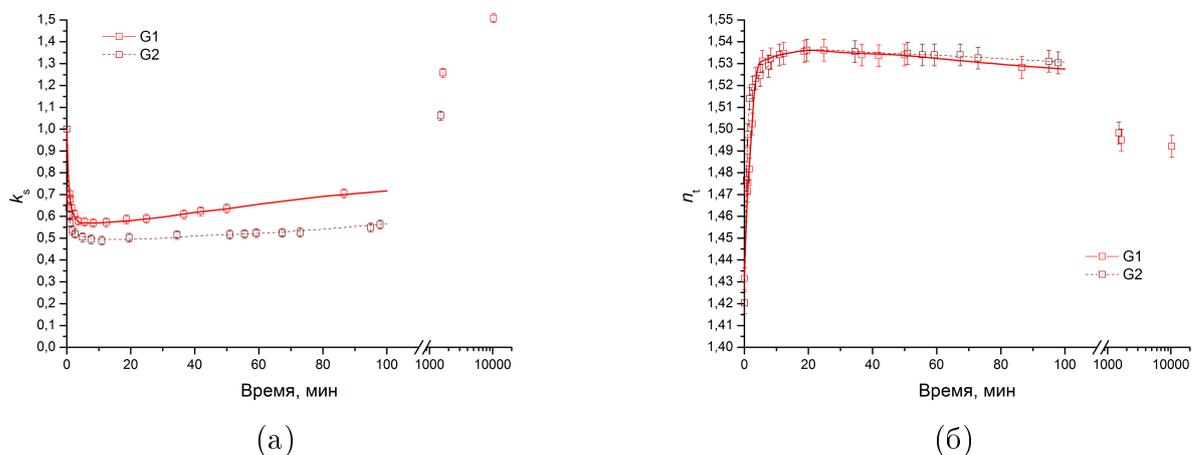


Рисунок 4.18. Экспериментальные зависимости коэффициента изменения объема k_s (а) и среднего группового показателя преломления ткани n_t (б) от времени для двух образцов вторичных коллагеновых пучков, просветлявшихся в 82,3% водном растворе глицерина.

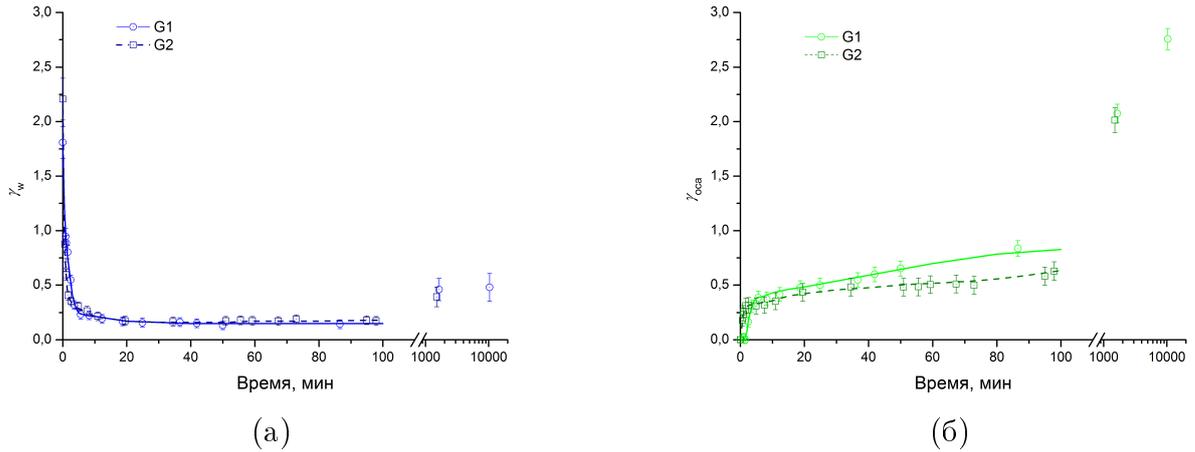
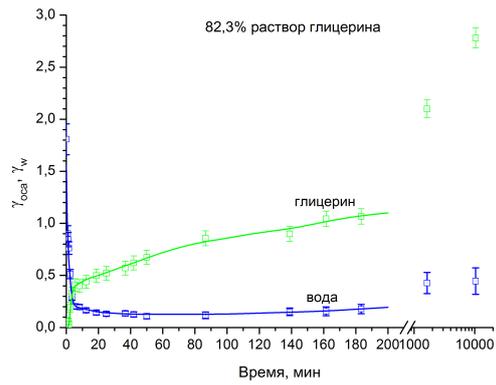


Рисунок 4.19. Изменение содержания воды (а) и глицерина (б) в образцах, просветлявшихся в 82,3% водном растворе глицерина.

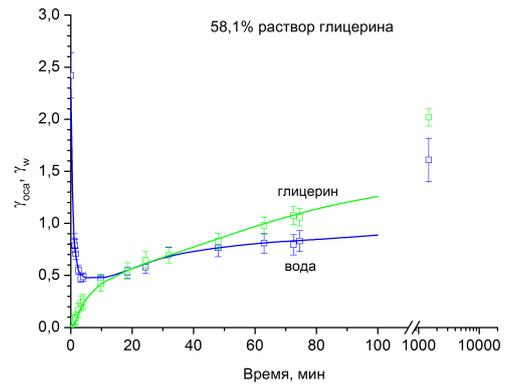
На рисунке 4.20 сравниваются данные по изменению удельного содержания глицерина и воды в образцах при их просветлении в растворах глицерина различной концентрации. Аналогичные графики для объемной концентрации воды и глицерина приведены на рисунке А.7 в приложении А. На рисунке 4.21 показаны оценки отношения объемного содержания глицерина (V_{glyc}) к общему объемному содержанию глицерина и воды ($V_{\text{glyc}} + V_w$) в ткани, $c_{g-t} = V_{\text{glyc}} / (V_{\text{glyc}} + V_w)$. Это отношение рассчитывалось как

$$c_{g-t} = \frac{\gamma_{\text{oca}}}{\gamma_{\text{oca}} + \gamma_w}. \quad (4.39)$$

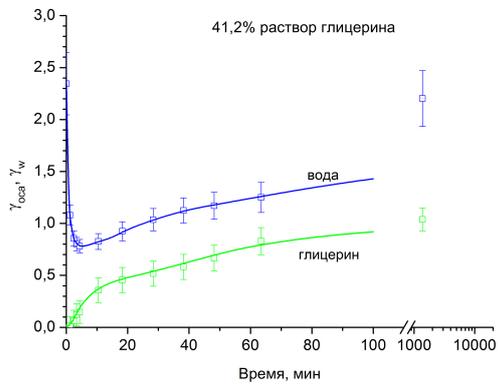
Как видно из рисунка 4.20 уровень содержания воды в ткани, достигаемый к моменту окончания стадии быстрой дегидратации повышается с увеличением содержания воды в иммерсионной жидкости. С определенного момента времени после стадии быстрой дегидратации в ткани повышается как содержание глицерина, так и содержание воды. При этом, как видно из рисунка 4.21, со временем параметр c_{g-t} становится близким по величине к содержанию глицерина в иммерсионной жидкости, окружающей образец. Содержание глицерина в ткани через час с момента погружения образца в иммерсионную жидкость оказалось наибольшим в случае, когда в качестве иммерсионной жидкости использовался 58,1% раствор глицерина.



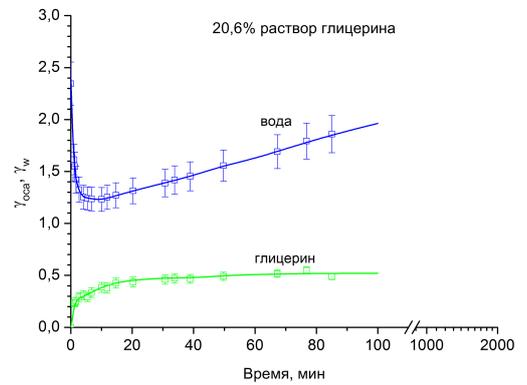
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 4.20. Изменение удельного содержания глицерина и воды в ткани с момента погружения образца в иммерсионную жидкость для образцов, просветлявшихся в 82,3% растворе глицерина (а), 58,1% растворе глицерина (б), 41,2% растворе глицерина (в) и 20,6% растворе глицерина (г).

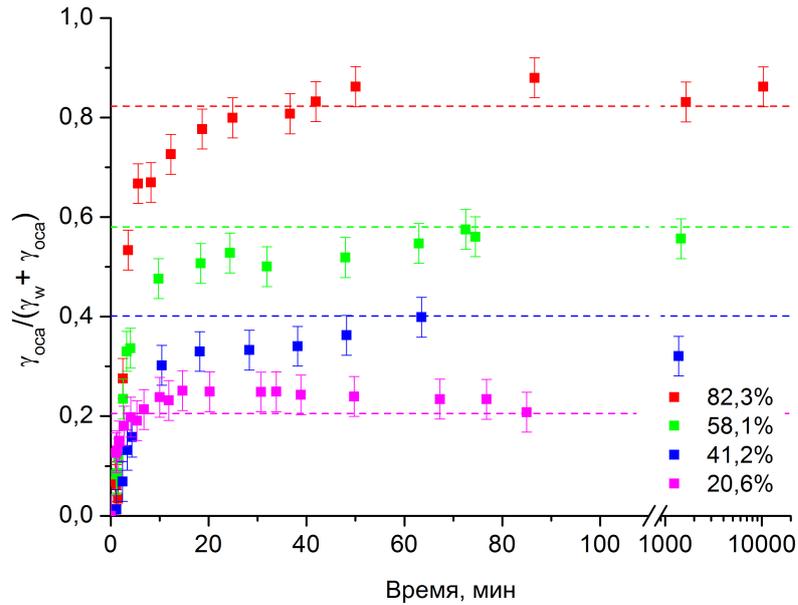


Рисунок 4.21. Изменение отношения объемного содержания глицерина к общему объемному содержанию глицерина и воды в ткани с момента погружения образца в иммерсионную жидкость при просветлении образцов в растворах глицерина разной концентрации. Пунктирными линиями показаны уровни содержания глицерина в иммерсионных растворах.

На рис. 4.22 и 4.23 представлены результаты оценок изменения γ_w и $\gamma_{\text{оса}}$ при просветлении коллагеновых пучков в растворе глюкозы, в Омнипак, в ПЭГ, и в растворе пропиленгликоля. В данном случае $\gamma_{\text{оса}}$ для растворов глюкозы и пропиленгликоля характеризует содержание в ткани иммерсионной жидкости как целого, а не ее неводной составляющей (как в предыдущем примере).

Данные, полученные при просветлении в 89% растворе пропиленгликоля (рис. 4.22(a)), позволяют говорить о том, что изменение состава ткани в процессе иммерсионного просветления в данном случае может быть интерпретировано как постепенное замещение воды, изначально присутствующей в ткани, иммерсионной жидкостью. Содержание водной составляющей, обуславливающей превышение концентрации воды в системе пропиленгликоль–вода в ткани над концентрацией воды в иммерсионной жидкости, постепенно приближается к очень малым значениям.

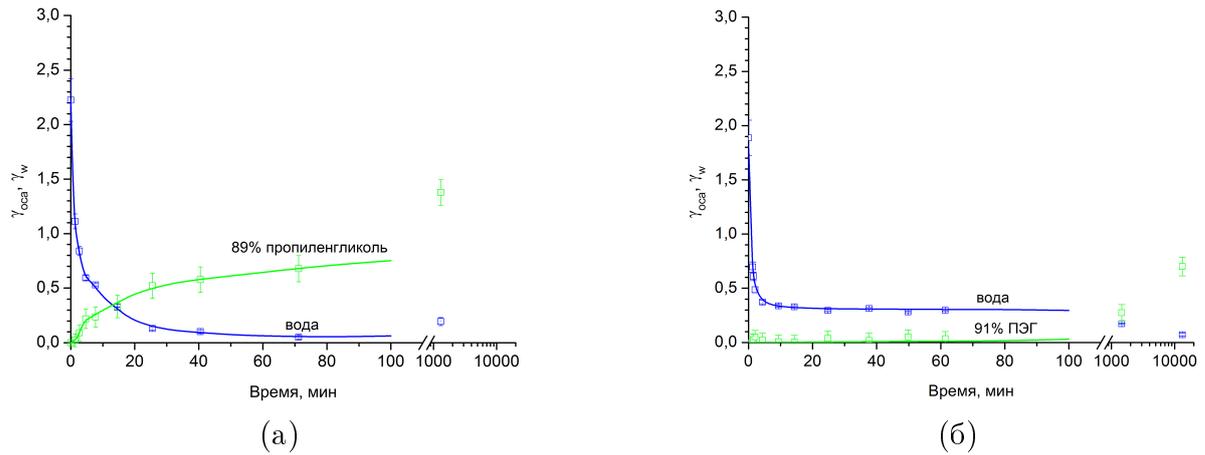


Рисунок 4.22. Изменение удельного содержания иммерсионной жидкости и воды в ткани с момента погружения образца в иммерсионную жидкость для образцов, просветлявшихся в 89% растворе пропиленгликоля (а) и 91% растворе ПЭГ (б).

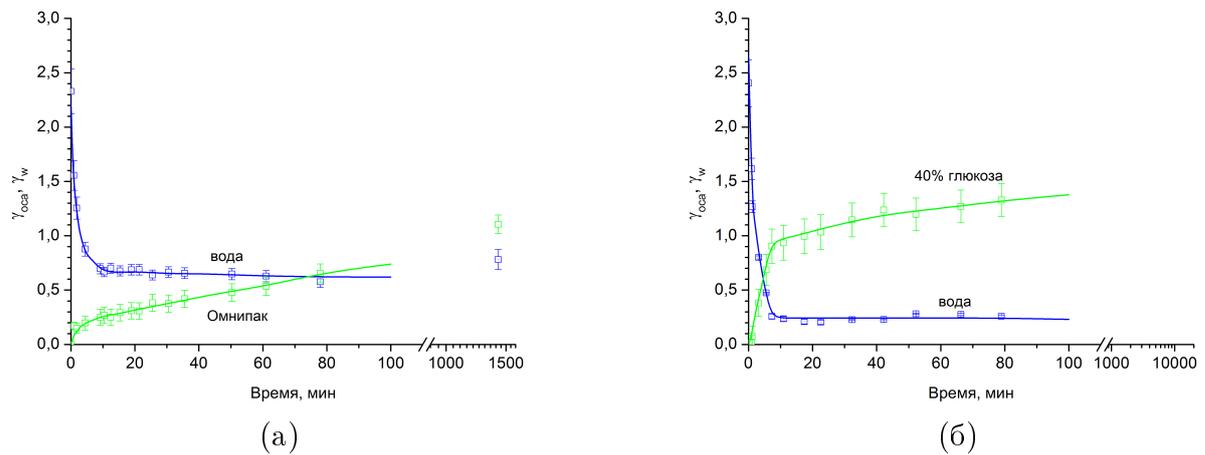


Рисунок 4.23. Изменение удельного содержания иммерсионной жидкости и воды в ткани с момента погружения образца в иммерсионную жидкость для образцов, просветлявшихся в 89% растворе пропиленгликоля (а) и 91% растворе ПЭГ (б).

Данные для случая 91% раствора ПЭГ (рис. 4.22(б)) соответствуют тому, что было сказано о концентрированных растворах ПЭГ как иммерсионных агентах выше. Долгое время (более 100 минут) после стадии быстрой дегидратации изменения в содержании компонент в ткани не заметны. Но, несмотря на большую длину молекул агента и малое количество межфибриллярной жидкости, оставшейся в ткани после этапа быстрой дегидратации, уже через день хранения образцов в ПЭГ содержание ПЭГ в ткани становится существенным ($\sim 0,3$ относительно "сухого" объема).

И при просветлении образцов в Омнипак-300 и 40% растворе глюкозы на этапе быстрой дегидратации уменьшение объема ткани было значительным (около 40%). На последующей стадии, как следует из данных, представленных на рис. 4.23, в обоих случаях процесс измене-

ния состава жидкостей в ткани можно условно охарактеризовать как увеличение содержания иммерсионной жидкости при удерживании некоторого фиксированного уровня содержания в ткани воды, не входящей в состав иммерсионной жидкости

4.3.5 Оценка иммерсионных агентов в контексте их применения при поляризационном картировании тканей

В предыдущем разделе уже были отмечены некоторые преимущества, которые дает использование в качестве иммерсионного агента концентрированного раствора глицерина. Однако, иммерсия в концентрированных растворах глицерина приводит к сильному уменьшению показателя двулучепреломления ткани. Это может оказаться неприемлемым при работе с тонкими образцами тканей с невысокой степенью ориентационной упорядоченности коллагеновых волокон, таких как склера и дерма. Характеристическая фазовая задержка таких образцов часто является малой и становится недопустимо малой при значительном ее уменьшении под действием иммерсионного агента. С этой точки зрения такие иммерсионные агенты, как раствор глюкозы, Омнипак и ПЭГ, представляют значительный интерес. Они позволяют добиться хорошего уровня прозрачности ткани без сильного уменьшения показателя двулучепреломления ткани. О последнем свидетельствуют данные, представленные на рис. 4.11 и 4.16. Заметим, что уровень дегидратации ткани, достигаемый после этапа быстрой дегидратации, как и количество иммерсионного агента, проникшего в ткань к окончанию этого этапа, для трех указанных агентов является очень разным. Это говорит о том, что основные факторы, обуславливающие сохранения достаточно высокого двулучепреломления, для этих агентов также являются разными.

4.4 Теоретическая модель двулучепреломления коллагеновых волокон

Как известно, двулучепреломление коллагеновых волокон определяется двумя главными факторами: собственным двулучепреломлением коллагена и двулучепреломлением формы [222]. Собственное двулучепреломление коллагена обусловлено анизотропией поляризуемости фрагментов молекул тропоколлагена и преимущественной ориентацией этих фрагментов вдоль оси фибрилл. Двулучепреломление формы обусловлено цилиндрической формой фибрилл и их параллельным расположением. Исходя из этого, показатель двулучепрелом-

ления коллагенового волокна может быть приближенно выражен следующим образом:

$$\Delta n_t = c_c \Delta n_{Ic} + \Delta n_f, \quad (4.40)$$

где c_c – объемное содержание фибриллярного коллагена, Δn_{Ic} – удельный показатель собственного двулучепреломления коллагена, Δn_f – вклад двулучепреломления формы. Для диапазона размеров и показателей преломления, характерных коллагеновым фибриллам, хорошую оценку вклада двулучепреломления формы дает приближенная формула Хеменгера [223] для системы параллельных диэлектрических цилиндров:

$$\Delta n_f = \frac{f_1 f_2 (n_1 - n_2)^2}{f_1 n_1 + f_2 n_2}, \quad (4.41)$$

где f_1 – объемная доля цилиндров, f_2 – объемная доля вещества, окружающего цилиндры, а n_1 и n_2 – соответствующие показатели преломления (рис. 4.24).

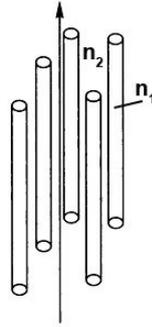


Рисунок 4.24. Система параллельных цилиндров.

Используя приближение (4.41), можно выразить второе слагаемое в (4.40) следующим образом:

$$\Delta n_f = \frac{c_{fb} c_m (n_{fb} - n_m)^2}{n_t}, \quad (4.42)$$

где n_t – средний показатель преломления ткани, n_{fb} – средний показатель преломления фибрилл, n_m – средний показатель преломления внутритканевой жидкости внутри пучка (межфибриллярной жидкости), c_{fb} – объемная доля фибрилл, а c_m – объемная доля межфибриллярной жидкости ($c_m = 1 - c_{fb}$). Отсюда, используя обычные приближения, можно получить соотношения, позволяющие оценить по данным рассматриваемого эксперимента содержание воды в фибриллах и межфибриллярной жидкости по отдельности (пока мы предполагаем отсутствие иммерсионного агента в ткани). Приближенно приняв объем фибрилл, V_{fb} , равным сумме объема фибриллярного коллагена, V_c , и объема воды, находящейся внутри фибрилл,

V_{w-fb} , а объем межфибриллярной жидкости, V_m , равным сумме объема воды, находящейся в межфибриллярном пространстве, V_{w-m} , и объема, занятого протеогликанами и прочими компонентами межфибриллярной жидкости, V_p , используя правило Гладстона-Даля, получаем следующие выражения для показателей преломления n_{fb} и n_m :

$$n_{fb} = \frac{n_c V_c + n_w V_{w-fb}}{V_c + V_{w-fb}}, n_m = \frac{n_p V_p + n_w V_{w-m}}{V_p + V_{w-m}}, \quad (4.43)$$

где n_c – показатель преломления коллагена, а n_p – средний показатель преломления неводной составляющей межфибриллярной жидкости (протеогликанов и т.п.). Объем неводной составляющей всего пучка, V_{dry} , может быть выражен как $V_{dry} = V_c + V_p$, а общий объем воды в ткани – как $V_w = V_{w-fb} + V_{w-m}$. Для характеристики распределения воды между фибриллами и межфибриллярной жидкостью введем параметры $w_{fb} = V_{w-fb}/V_w$ и $w_m = V_{w-m}/V_w$. Учитывая, что

$$w_{fb} = 1 - w_m, \quad (4.44)$$

выразим V_{w-m} и V_{w-fb} как

$$V_{w-m} = w_m V_w, V_{w-fb} = (1 - w_m) V_w. \quad (4.45)$$

Также введем параметры

$$h_c = V_c/V_{dry}, h_p = V_p/V_{dry}, h_{pc} = h_p/h_c, \quad (4.46)$$

характеризующие объемное содержание фибриллярного коллагена и прочих веществ относительно общего объема неводной составляющей ткани. Согласно (4.43)

$$n_{fb} - n_m = \frac{n_c V_c + n_w V_{w-fb}}{V_c + V_{w-fb}} - \frac{n_p V_p + n_w V_{w-m}}{V_p + V_{w-m}}. \quad (4.47)$$

Поделив числители и знаменатели в этом выражении на V_c и, используя подстановки (4.46) и (4.47), находим, что

$$n_{fb} - n_m = \frac{n_c + n_w (1 - w_m) H_c}{1 + (1 - w_m) H_c} - \frac{n_p h_{pc} + n_w w_m H_c}{h_{pc} + w_m H_c}, \quad (4.48)$$

где $H_c = H_V/h_c$. Напомним, что $H_V = V_w/V_{dry}$ – это объемный параметр гидратации ткани, который непосредственно оценивается в рассматриваемом эксперименте (4.30). При дегидратации или регидратации ткани из величин, входящих в (4.48), изменяются только H_V и w_m .

Аналогичным образом можно выразить объемную долю фибрилл и объемную долю межфибриллярной жидкости, а также объемную долю фибриллярного коллагена:

$$c_{\text{fb}} = \frac{V_c + V_{w\text{-fb}}}{V_{\text{dry}} + V_w} = \frac{h_c + (1 - w_m) H_V}{1 + H_V} = h_c \frac{1 + (1 - w_m) H_c}{1 + H_V}, \quad (4.49)$$

$$c_m = \frac{V_p + V_{w\text{-m}}}{V_{\text{dry}} + V_w} = \frac{h_p + w_m H_V}{1 + H_V} = h_c \frac{h_{\text{pc}} + w_m H_c}{1 + H_V}, \quad (4.50)$$

$$c_c = \frac{V_c}{V_{\text{dry}} + V_w} = \frac{h_c}{1 + H_V}. \quad (4.51)$$

Используя последнее уравнение, представим первое слагаемое в (4.40) в виде

$$c_c \Delta n_{\text{Ic}} = \frac{h_c}{1 + H_V} \Delta n_{\text{Ic}}. \quad (4.52)$$

Это приводит к следующему выражению для оценки текущего значения Δn_f по экспериментальным данным для Δn_t и H_V :

$$\Delta n_f = \Delta n_t - \frac{h_c}{1 + H_V} \Delta n_{\text{Ic}}. \quad (4.53)$$

С другой стороны, подстановка (4.48), (4.49) и (4.50) в (4.42) приводит к следующему уравнению:

$$\Delta n_f = \frac{A_0}{n_t} \frac{(A_1 + A_2 w_m)^2}{A_3 + A_4 w_m - A_5 w_m^2}, \quad (4.54)$$

где

$$A_0 = \left(\frac{h_c}{1 + H_V} \right)^2, \quad A_1 = (n_c - n_p) h_{\text{pc}} - (n_p - n_w) h_{\text{pc}} H_c,$$

$$A_2 = [n_c - n_w + (n_p - n_w) h_{\text{pc}}] H_c, \quad A_3 = h_{\text{pc}} + H_c h_{\text{pc}},$$

$$A_4 = H_c^2 + H_c (1 - h_{\text{pc}}), \quad A_5 = H_c^2.$$

Решая это уравнение относительно w_m , получаем

$$w_m = \frac{A_6 A_4 - 2A_1 A_2 \pm \sqrt{(2A_1 A_2 - A_6 A_4)^2 - 4(A_2^2 + A_6 A_5)(A_1^2 - A_6 A_3)}}{2(A_2^2 + A_6 A_5)}, \quad (4.55)$$

где

$$A_6 = \Delta n_f \frac{n_t}{A_0}.$$

Таким образом при известных значениях параметров n_c , n_w , Δn_{Ic} , n_p и h_c , пользуясь полученными оценками H_V , n_t и Δn_t , по приведенным формулам можно найти w_m и w_{fb}

(см.(4.44)), то есть оценить, какая доля воды, присутствующей в ткани, находится вне фибрилл, а какая – в фибриллах. Поскольку подавляющую долю сухой массы коллагенового пучка составляет коллаген, в первом приближении можно принять n_c равным $n'_{dry} = 1,594$ (4.19). Большую часть неводной составляющей межфибриллярной жидкости в коллагеновых волокнах составляют протеогликаны. Их показатель преломления близок по величине к показателю преломления сухого коллагена. Малость содержания протеогликанов в ткани позволяет использовать в данной задаче грубые оценки n_p . Поэтому можно приближенно принять $n_p = n_c$. В этом приближении, для сухого состояния ткани ($H_V = 0$), $\Delta n_f = 0$ и, согласно (4.40) и (4.51), $\Delta n_t = h_c \Delta n_{Ic}$. Это дает возможность оценить удельный показатель собственного двулучепреломления коллагена по измеренному значению показателя двулучепреломления Δn_t для сухого состояния по формуле

$$\Delta n_{Ic} = \Delta n_t / h_c. \quad (4.56)$$

Согласно нашим экспериментальным данным (рис. 4.11) при $H_V = 0$ $\Delta n_t \approx 0,00733$. Согласно литературным данным в сухожильных пучках коллагены, как химические вещества, составляют до $\sim 91\%$ сухой массы [44, 53], при этом практически весь коллаген, входящий в первичные коллагеновые пучки (коллагены типа I, V XII и XIV), содержится в фибриллах [224]. По мере развития организма удельное содержание коллагена в пучках возрастает, тогда как содержание протеогликанов и клеток (фибробластов) существенно уменьшается [53]. Для зрелых особей протеогликаны в сухожильных пучках хвоста крыс, судя по литературным данным [44], составляют меньше 1% процента сухого веса. В воздушносухом состоянии ткани, достигаемом при ее выдерживании при 105°C , коллагеновые фибриллы содержат в себе некоторое количество связанной воды. Содержание сильно связанной воды в сухожилиях оценивается как 0,07 г воды на 1 г коллагена [216]. В нашем анализе эта сильно связанная вода рассматривалась как неотъемлемая часть коллагеновых фибрилл, входящая в их состав в сухом состоянии, то есть значение степени гидратации ткани $H_V = 0$ соответствовало слабо гидратированному состоянию ткани, с содержанием воды порядка 0,07 г воды на 1 г коллагена. Рассматривая сильно связанную воду как входящую в состав фибрилл в сухом состоянии, в качестве диапазона возможных значений параметра h_c в наших экспериментах, исходя из приведенных данных, мы приняли диапазон от 0,97 до 0,99. При таких значениях h_c и $\Delta n_t = 0,00733$ формула (4.56) дает значения удельного группового показателя собственного двулучепреломления коллагена Δn_{Ic} от 0,0074 до 0,00756.

На рисунке 4.25 показана рассчитанная по данным нашего эксперимента при $h_c = 0,99$ и $\Delta n_{tc} = 0,0074$ зависимость параметра гидратации фибрилл H_{fb} определяемого как $H_{fb} = V_{w-fb}/V_{dry}$, от H_V . Параметр H_{fb} рассчитывался по формуле $H_{fb} = w_{fb}H_V$ по экспериментальным значениям H_V и найденным по формулам (4.44) и (4.55) значениям w_{fb} . Экспериментальные точки (H_V, H_{fb}) показаны теми же символами, что и соответствующие им точки $(H_V, \Delta n_t)$ на рис. 4.11. Как видно из рис. 4.25, при малых значениях H_V количество воды в фибриллах увеличивается с увеличением H_V . Затем, после преодоления уровня гидратации ткани $H_V = 1$, количество воды в фибриллах с увеличением H_V практически перестает увеличиваться – наблюдается плато на уровне гидратации фибрилл 0,6-0,7. Согласно представленным данным, при регидратации ткани из сухого состояния объем фибрилл сначала увеличивается на 60-70% и при дальнейшей гидратации ткани остается почти неизменным, то есть на второй стадии с увеличением содержания воды в ткани существенно увеличивается только объем межфибрилярной жидкости. Насколько нам известно, впервые экспериментальные данные, указывающие на такой сценарий гидратации коллагеновых волокон, были представлены в работе [218]. Эти данные были получены в результате рентгеноструктурных исследований сухожилий и костей крысы. Дальнейшие рентгеноструктурные исследования коллагеносодержащих тканей, таких как роговица и сухожилие [219–221], подтвердили справедливость выводов работы [218] относительно характера гидратации коллагеновых волокон. Во всех перечисленных исследованиях изменение радиуса фибрилл при изменении содержания воды в ткани оценивалось по изменению характерного поперечного расстояния между молекулами коллагена. Последнее непосредственно оценивалось по картинам дифракции рентгеновских лучей. В настоящей работе мы пришли к тем же заключениям на основе данных оптических измерений. Отметим хорошее количественное соответствие наших данных, полученных посредством оценки двулучепреломления ткани (рис. 4.25), с результатами, полученными с помощью рентгеноструктурного анализа для сухожилия хвоста крысы [219]. Экспериментальные данные на рис. 4.25 аппроксимированы функцией вида

$$f(x) = \begin{cases} Ax, & x \leq \frac{pY}{A} \\ Y - \frac{A^2}{4Y(1-p)} \left[x + \frac{Y}{A} (p-2) \right]^2, & \frac{pY}{A} < x \leq (2-p) \frac{Y}{A} \\ Y, & x > (2-p) \frac{Y}{A} \end{cases} \quad (4.57)$$

при

$$A = 0,9729, p = 0,1034, Y = 0,6404.$$

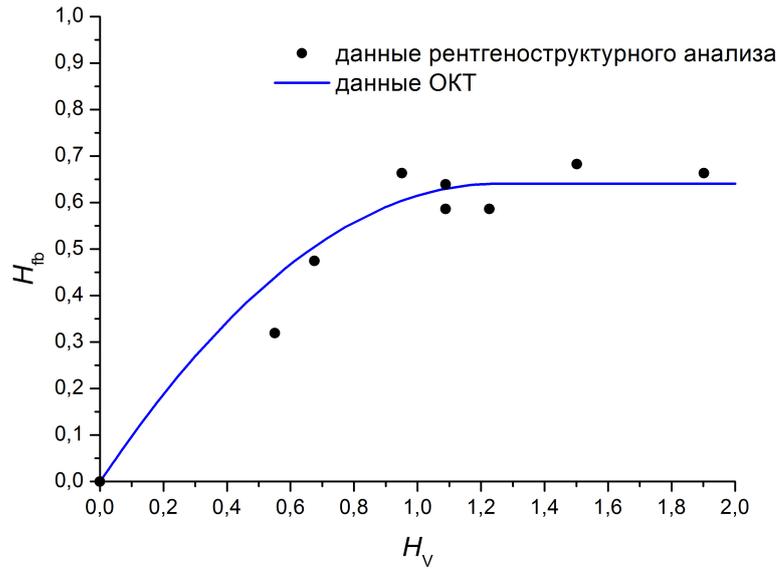


Рисунок 4.26. Сравнение экспериментальных данных для степени гидратации коллагеновых фибрилл как функции степени гидратации ткани, полученных нами посредством оценки двулучепреломления ткани методом ОКТ, с литературными данными [219], полученными с помощью рентгеноструктурного анализа.

– аналогичный параметр, характеризующий содержание жидкости (вода + иммерсионный агент) в фибриллах, для образцов, просветляемых в различных иммерсионных агентах. Представленные кривые получены в предположении, что отношение содержания иммерсионного агента к содержанию воды одинаково внутри фибрилл и во внефибрилярном пространстве. Есть основания полагать, что для многих низкомолекулярных иммерсионных агентов это допущение оправдано. Для сравнения на рис. 4.27 приведена и аппроксимирующая кривая дегидратации-регидратации, представленная на двух предыдущих графиках. Согласно представленным на рис. 4.27 оценкам на этапе быстрой дегидратации во всех рассматриваемых случаях размер фибрилл почти не меняется – точки состояния двигаются по плато. На следующем этапе, когда определяющую роль начинает играть диффузия иммерсионного агента в ткань, в случае Омнипак точка состояния движется по плато в обратную сторону, то есть никакого изменения размера фибрилл не происходит. Для остальных рассматриваемых иммерсионных агентов данные указывают на увеличение объема фибрилл со временем, по мере увеличения содержания иммерсионного агента в ткани.

Одним из факторов, неучтенных в оценках, представленных на рис. 4.27, является возможное уменьшение удельного показателя собственного двулучепреломления Δn_{1c} в результате взаимодействия коллагена с иммерсионным агентом. А оно действительно может происходить, и в некоторых случаях степень изменения Δn_{1c} в процессе иммерсионного просветления

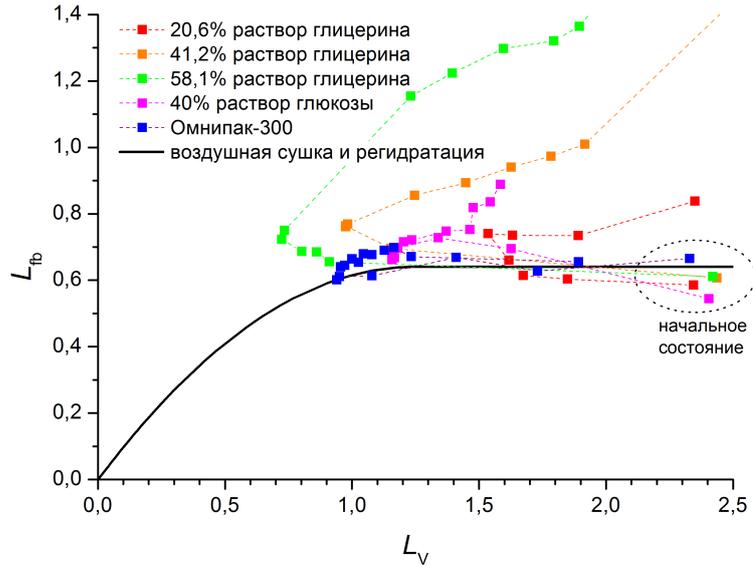


Рисунок 4.27. Изменение удельного содержания жидкости (вода + иммерсионный агент) в коллагеновых фибриллах при оптическом просветлении коллагеновых пучков в различных иммерсионных средах.

может быть оценена по данным измерений, получаемых при использовании разработанной ОКТ-методики. В качестве примера на рисунке 4.28 показаны траектории эволюции параметров образцов (кривые состояния) в пространстве $(L_V, \Delta n_t)$. Сплошными черными линиями показаны теоретические кривые эволюции, рассчитанные в предположении, что система не проявляет двулучепреломления формы совсем, при разных величинах удельного показателя собственного двулучепреломления среды. Отсюда легко увидеть два случая, когда уменьшение удельного показателя собственного двулучепреломления Δn_{lc} точно происходит. Поскольку, вклад двулучепреломления формы для системы цилиндров не может быть отрицательным, при отсутствии такого уменьшения экспериментальная кривая состояния образца не может пересекать верхнюю черную линию, соответствующую $\Delta n_{lc} = 0,0074$. А она в двух случаях, в случае 82,3% раствора глицерина и в случае 58,1% раствора глицерина, пересекается кривыми состояния. Значительное понижение Δn_{lc} в процессе иммерсионного просветления образцов в растворах глицерина, очевидно, является результатом диссоциации коллагеновых фибрилл в этих растворах [225].

4.5 Заключение к главе 4

Таким образом, в данной главе представлена оригинальная ОКТ-методика оценки содержания воды в ткани при дегидратации и регидратации, основанная на измерении среднего

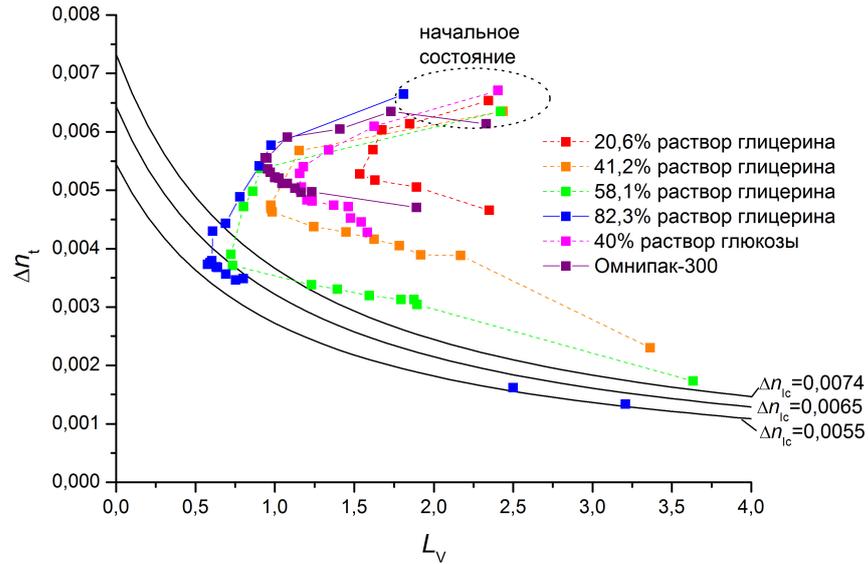


Рисунок 4.28. Изменение среднего группового показателя двулучепреломления коллагеновых пучков и содержания жидкости (вода + иммерсионный агент) в ткани при иммерсионном просветлении.

группового показателя преломления ткани. Показано, что данная методика может быть применена для таких коллагенсодержащих тканей, как сухожилие, роговица и склера. Также представлена разработанная эффективная ОКТ-методика, позволяющая оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации, которая может быть использована при изучении взаимодействия иммерсионных агентов с тканью. Представлены результаты исследования изменений характеристик двулучепреломления коллагеновых волокон, позволяющие оценить изменение содержания воды в фибриллах и интерстициальной жидкости при дегидратации и регидратации ткани, а также при иммерсионном просветлении. Полученные экспериментальные результаты подтверждают адекватность модели распределения воды в фибриллах и интерстициальной жидкости, разработанной в работах [218–221] на основе данных рентгеноструктурного анализа.

Глава 5

Изучение возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани

Оптическое просветления тканей, как правило, осуществляется с использованием осмотически активных агентов, таких как пропиленгликоль [7], тразограф [171] глюкоза [5,173] [199], глицерин [174], полиэтиленгликоль (ПЭГ) [8]. Использование таких иммерсионных агентов сопровождается частичным обезвоживанием ткани. При применении такого иммерсионного просветления процедура кросслинкинга будет осуществляться в условиях, когда в ткани содержится значительно меньшее количество воды, чем в нативном состоянии. Заметим, что стандартные процедуры кросслинкинга предполагают сшивание ткани в условиях гидратации близких к естественным. Дегидратация ткани приводит к уменьшению расстояния между коллагеновыми фибриллами, что может увеличить вероятность образования прямых или опосредованных (через протеогликаны) межфибриллярных связей. При больших степенях дегидратации и диаметр коллагеновых фибрилл может оказаться меньшим, чем в нативном состоянии [219]. Фотосшивание фибриллы в таком дегидратированном состоянии может привести к тому, что после регидратации ее диаметр будет меньше, чем в нативном состоянии. И то, и другое, по всей видимости, должно проявиться в том, что фотосшитая ткань после ее регидратации будет иметь меньший объем, чем в исходном состоянии, то

есть после фотосшивания и регидратации образовавшиеся сшивки будут удерживать ткань в контрактированном состоянии. Вопрос о том, возможно или нет удержание (фиксирование) контрактированного состояния ткани в конкретных условиях, несомненно, является очень важным. Оценка возможности фиксирования контрактированного состояния ткани после рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженных уровнях гидратации ткани и является целью исследований, представленных в данной главе. Результаты исследования опубликованы в работе [226].

5.1 Материалы и методы

В качестве образцов использовались вторичные сухожильные пучки из хвоста крысы диаметром 300 до 450 мкм. Для измерений использовался оптический когерентный томограф ThorLabs-ОСР930SR. Перед измерениями исследуемый сухожильный пучок закреплялся зажимами на предметном стекле в слегка натянутом состоянии. Затем пучок окружался физиологическим раствором, накрывался покровным стеклом и устанавливался в ОКТ-систему так, чтобы направление пучка было перпендикулярно направлению В-сканирования. Для того чтобы покровное стекло не надавливало на образец, между предметным и покровным стеклами размещались спейсеры толщиной 1 мм. Затем фиксировалось ОКТ-изображения поперечного сечения образца в нативном состоянии в двух областях, одна из которых впоследствии подвергалась УФ облучению, а вторая – нет. После этого физиологический раствор заменялся на 0,1% раствор рибофлавина в физиологическом растворе, и образец выдерживался в нем в течение 20 минут. Затем раствор рибофлавина удалялся с предметного стекла, образец окружался большим количеством иммерсионного агента и снова накрывался покровным стеклом. После этого регистрировались ОКТ-изображения образца в двух рассматриваемых областях. В качестве иммерсионных агентов использовались 37%, 58,5%, 87% водные растворы полиэтиленгликоля ПЭГ-300, содержащие 0,1% рибофлавина. Время выдерживания образцов в просветляющих агентах выбиралось таким, чтобы этого времени было достаточно для достижения образцом минимального объема. Для 58,5% и 87% растворов ПЭГ время выдерживания составляло 10 минут, для 37% ПЭГ – 15 минут. После иммерсионной дегидратации иммерсионный раствор удалялся с помощью фильтровальной бумаги, и участок образца длиной 4,5 мм подвергался облучению ультрафиолетовым излучением с длиной волны 365 нм в течение 10 минут. Плотность ультрафиолетового излучения на поверхности образца составляла 33,1 мВт/см². После облучения образец окружался большим количеством физиологического раствора для регидратации ткани. В течение 2 часов ре-

гидратации через определенные промежутки времени регистрировались ОКТ-изображения пучка в обеих областях. Пример трансформации ОКТ-изображений сухожильного пучка на этапе дегидратации и регидратации показан на рисунке 5.1. По истечении 2 часов заметных изменений параметров образца не происходило. На основании этого был сделан вывод, что за 2 часа образец достигает насыщенного регидратированного состояния, то есть состояния, при котором дальнейшего увеличения содержания воды в образце не происходит.

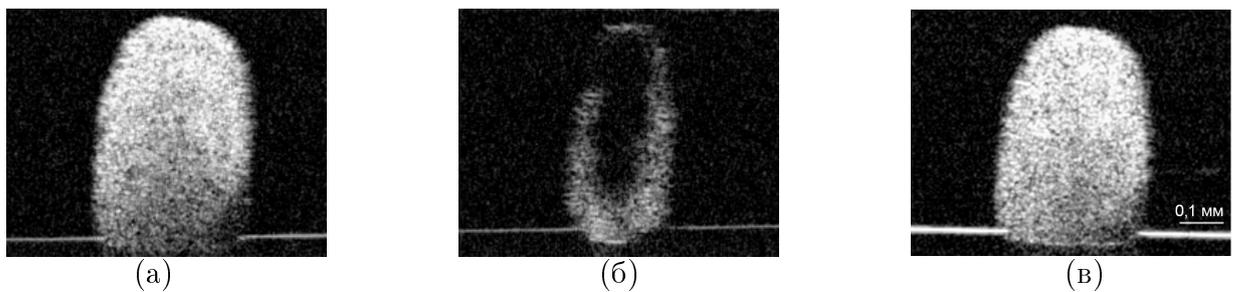


Рисунок 5.1. ОКТ-сканы образца сухожильного пучка в нативном состоянии (а), после дегидратации в 37% растворе ПЭГ (б) и после облучения и регидратации в физиологическом растворе (в). Масштаб на всех сканах одинаков.

Групповой показатель преломления ткани n_t оценивался по смещению изображения верхней поверхности предметного стекла под образцом по методике, представленной в главе 4, и рассчитывался посредством усреднения значений, полученных для 3 линий А-сканирования. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета прикладных программ "STATISTICA 10".

Для оценки содержания воды в ткани c_w нами использовалась аппроксимационная формула (4.19). Объемная степень гидратации ткани рассчитывалась по полученным значениям объемной доли воды c_w по формуле (4.30).

Для оценки зависимости степени контракции ткани после фотосшивания с предварительным просветлением от степени гидратации ткани после воздействия иммерсионного агента (степень гидратации в дегидратированном состоянии H_{V-deh}), при которой осуществлялось фотосшивание, рассчитывался коэффициент фотоиндуцированной контракции (K), определяемый как отношение объемов в исходном состоянии равновеликих областей в облученной (V_{cl}) и необлученной (V_{ncl}) частях образца, по формуле:

$$K = \frac{V_{cl}}{V_{ncl}} = \frac{1 + H_{V-cl}}{1 + H_{V-ncl}}. \quad (5.1)$$

5.2 Результаты и обсуждение

Среднее по всем образцам значение показателя преломления ткани в нативном состоянии составило $1,413 \pm 0,006$ (\pm SD). Согласно этой оценке, средняя степень гидратации H_V образцов в нативном состоянии составляла $2,53 \pm 0,28$.

Средние значения показателя преломления ткани в облученной и необлученной областях образца в регидратированном состоянии после просветления в рассматриваемых иммерсионных агентах представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1. Средние значения показателя преломления образцов сухожильных пучков после их дегидратации в растворе ПЭГ (n_{in-PEG}) и последующей регидратации в физиологическом растворе в течение 2 часов (n_{regid}) в облученной и необлученной областях. Все значения представлены в виде: среднее \pm стандартное отклонение

Иммерсионный агент	n_{in-PEG}	n_{regid}	
		облученная область	необлученная область
87% ПЭГ	$1,519 \pm 0,007$	$1,421 \pm 0,002$	$1,413 \pm 0,004$
58,5% ПЭГ	$1,496 \pm 0,006$	$1,422 \pm 0,001$	$1,418 \pm 0,001$
37% ПЭГ	$1,478 \pm 0,004$	$1,422 \pm 0,006$	$1,420 \pm 0,003$

Для образцов, дегидратированных перед процедурой фотосшивания в 87% растворе ПЭГ, среднее значение показателя преломления образцов в облученной области в регидратированном состоянии составило $1,421 \pm 0,002$, что заметно выше, чем среднее значение показателя преломления образцов в нативном состоянии ($1,413 \pm 0,006$). Анализ данных с помощью t -критерия Стьюдента (t) – проверялась гипотеза о равенстве средних значений у двух выборок с использованием двухвыборочного t -критерия для независимых выборок – показал, что различие средних значений указанных показателей преломления можно считать статистически значимым ($t = 4,34$ при $p = 0,00009$). При сравнении полученных значений показателей преломления образцов в исходном состоянии и в необлученной области в регидратированном состоянии статистически значимого различия между ними выявлено не было ($t = 0,13$ при $p = 0,89$). В то же время анализ показал, что различие средних значений показателей преломления в облученной и необлученной областях образцов в регидратированном состоянии можно считать статистически значимым ($t = 5,59$ при $p = 0,00003$). Это свидетельствует о том, что содержание воды в облученной области образцов после регидратации было меньше,

чем в необлученной области, то есть в результате фотосшивания произошла стабилизация контрактированного состояния ткани.

Статистическая обработка данных для образцов, дегидратированных в 37% ПЭГ перед процедурой фотосшивания, показала, что значения среднего показателя преломления ткани как в облученной, так и необлученной области образцов в регидратированном состоянии являются в среднем бóльшими, чем в нативном состоянии ($t = 2,94$ при $p = 0,0057$ и $t = 2,53$ при $p = 0,0158$, соответственно). Статистически значимого различия между средними значениями показателя преломления в облученной и необлученной областях образцов в регидратированном состоянии обнаружено не было ($t = 0,46$ при $p = 0,66$). Увеличение среднего показателя преломления ткани в регидратированном состоянии в необлученной области по сравнению с нативным состоянием в данном случае вероятно связано с диффузией молекул ПЭГ в приповерхностные области образца и сохранением их внутри образца при регидратации. С уменьшением концентрации ПЭГ в иммерсионном растворе скорость диффузии молекул ПЭГ в коллагенсодержащие ткани увеличивается, и вполне возможно, что при малых концентрациях ПЭГ за время иммерсионной дегидратации внутрь образца проникает значительное количество этого вещества. В пользу этого предположения говорит монотонный характер изменения показателя преломления в необлученной области образцов в регидратированном состоянии при изменении концентрации ПЭГ (см. таблицу 5.1).

Для разных образцов, дегидратированных в растворах с одной и той же концентрацией ПЭГ, наблюдался большой разброс значений показателя преломления ткани в достигнутом состоянии дегидратации. Это говорит о том, что степень гидратации разных образцов в дегидратированном состоянии была существенно различной. Для того чтобы проанализировать данные на предмет наличия корреляции между содержанием воды в ткани во время ее облучения и содержанием воды в ткани в регидратированном состоянии, мы сравнили зависимости разности показателей преломления образца после регидратации (n_{regid}) и в нативном состоянии (n_{native}) $n_{\text{regid}} - n_{\text{native}}$ от значения показателя преломления образца после воздействия иммерсионного агента ($n_{\text{in-PEG}}$) для облученной и необлученной областей. Экспериментальные точки представлены на рисунке 5.2. Также на этом рисунке представлены результаты линейной аппроксимации экспериментальных данных (метод наименьших квадратов) и значения коэффициента корреляции Пирсона. Как видно из представленных графиков, для облученной области существует тенденция к увеличению различия между n_{regid} и n_{native} с увеличением $n_{\text{in-PEG}}$. Для необлученной области такой тенденции не было выявлено. Для оценки влияния фотосшивания на величину показателя преломления образца в регидратированном состоянии на рис. 5.3 представлена зависимость разности показателей

преломления образцов в облученной и необлученной областях ($n_{\text{regid-cl}} - n_{\text{regid-ncl}}$) от показателя преломления образца в дегидратированном состоянии ($n_{\text{in-PEG}}$).

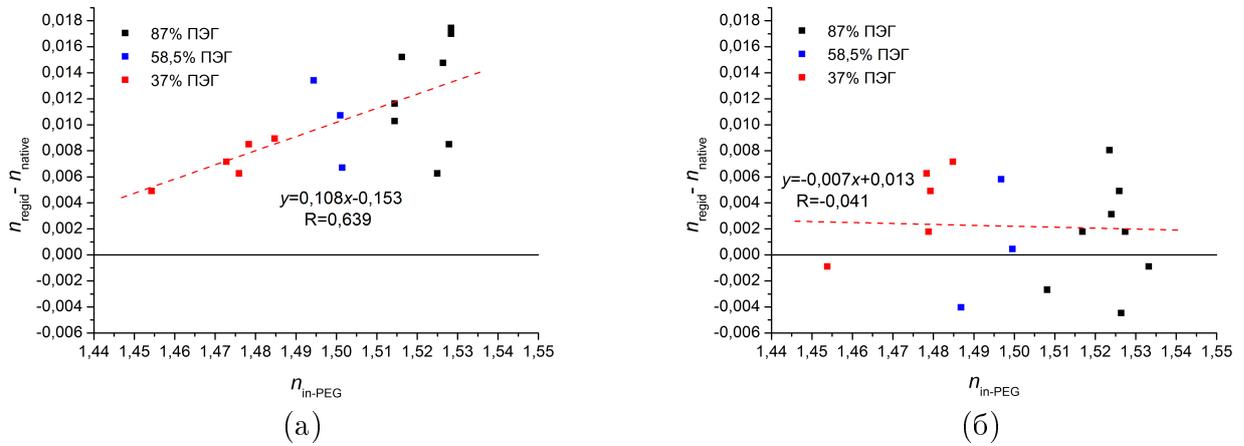


Рисунок 5.2. Зависимость разности показателя преломления сухожильного пучка после регидратации (n_{regid}) и его показателя преломления в нативном состоянии (n_{native}) от показателя преломления образца в дегидратированном состоянии ($n_{\text{in-PEG}}$) в облученной (а) и необлученной (б) области.

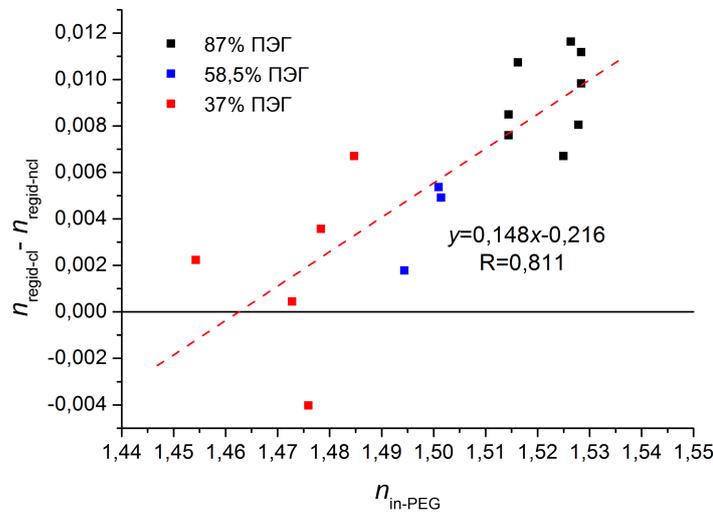


Рисунок 5.3. Зависимость разности показателей преломления сухожильного пучка в облученной и необлученной области после регидратации ($n_{\text{regid-cl}} - n_{\text{regid-ncl}}$) от значения показателя преломления образца в дегидратированном состоянии ($n_{\text{in-PEG}}$).

По данным, представленных на рисунках 5.2 и 5.3, в соответствии с формулами (4.30) и (5.1) были рассчитаны значения коэффициента фотоиндуцированной контракции K . На рисунке 5.4 представлены зависимости этого коэффициента от степени гидратации образца во время процедуры фотосшивания ($H_{V\text{-deh}}$). Из этого рисунка видно, что воздействие 87% раствора ПЭГ приводило к уменьшению уровня гидратации образцов до $H_{V\text{-deh}} = 0,345 - 0,455$,

а после фотосшивания в этом состоянии и регидратации относительное уменьшение объема облученной области составляло 8–15% ($K = 0,85 - 0,92$). Для образцов, просветлявшихся в растворах с меньшей концентрации ПЭГ (58,5% и 37%), значения K оказались близкими 1. В случае 58,5% раствора ПЭГ средний уровень гидратации H_{V-deh} составил 0,6, а среднее значение $K - 0,95$ ($n=3$). В случае 38% раствора ПЭГ эти величины составили соответственно 0,93 и 0,98 ($n=5$). Представленные данные позволяют сделать вывод, что при осуществлении рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани может происходить фиксирование контрактированного состояния ткани. Большая степень контракции (8–15%) может наблюдаться, если фотосшивание ткани проводится при уровне ее гидратации $H_{V-deh} < 0,5$. Если фотосшивание осуществляется при уровнях гидратации $H_{V-deh} > 0,8$, фиксирования контрактированного состояния ткани не происходит, то есть после регидратации ткань принимает объем близкий к исходному.

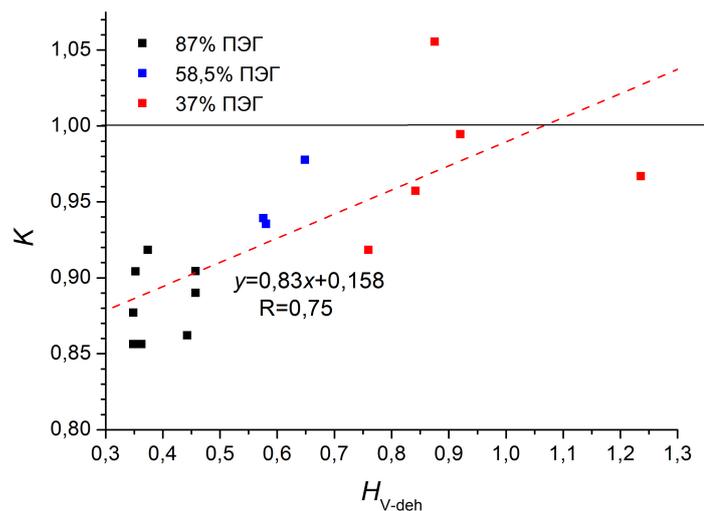


Рисунок 5.4. Зависимость коэффициента фотоиндуцированной контракции (K) от степени гидратации ткани во время УФ облучения (H_{V-deh}).

Фиксирование контрактированного состояния при рассматриваемом способе обработки ткани можно объяснить образованием новых связей между молекулами коллагена у поверхности дегидратированных фибрилл, которые не позволяют фибриллам восстановить свой первоначальный объем при регидратации. Напомним, что согласно анализу, проведенному в работе [108], связи между молекулами коллагена у поверхности фибрилл – это один из основных типов сшивок, возникающих в результате фотосшивания. Не исключена возможность образования и прямых межфибриллярных сшивок (связей между молекулами коллагена соседних фибрилл). При малых степенях гидратации ткани, соседние коллагеновые

фибриллы могут соприкасаться друг с другом, что увеличивает вероятность образования прямых межфибриллярных связей. Сшивки этого типа также способствуют стабилизации контрактированного состояния. Возможность образования прямых межфибриллярных сшивок, продемонстрировано в работе [10], в которой сильно обезвоженные ткани подвергались химическому кросслинкингу.

На рисунке 5.5, показана примерная упаковка фибрилл в сухожильном коллагеновом пучке при различных уровнях гидратации ткани. При создании представленных картин упаковки были использованы микрофотографии срезов сухожильных пучков, формула (4.57), а также эмпирические функции распределения фибрилл по размерам для сухожильных пучков, представленные в работе [218–221]. Как видно из этого рисунка, при уровнях гидратации ткани, фотосшивание при которых приводит к фиксированию контрактированного состояния, фибриллы плотно соприкасаются друг с другом, что, по всей видимости, является основным условием образования прямых межфибриллярных сшивок (сшивок между молекулами коллагена соседних фибрилл).

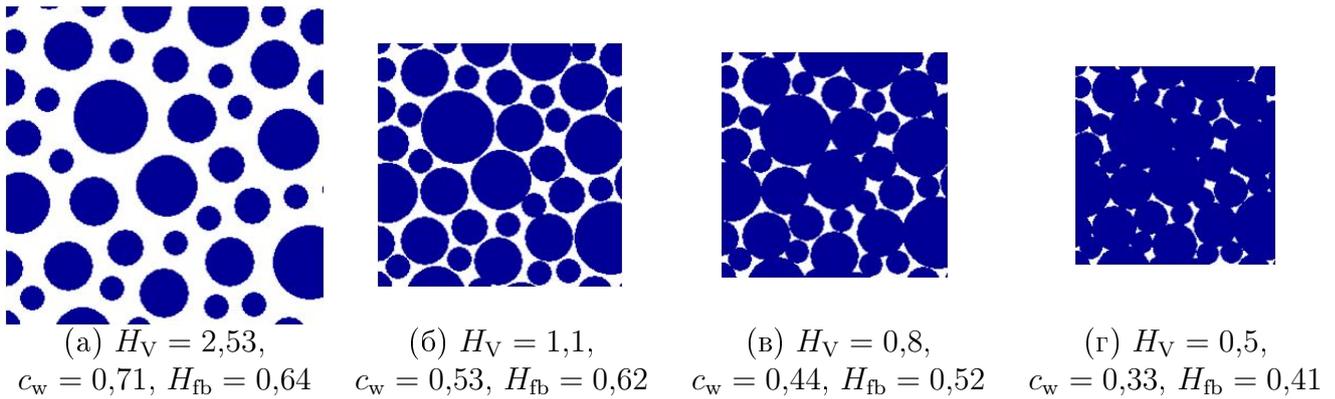


Рисунок 5.5. Примеры упаковки фибрилл в сухожильном коллагеновом пучке при различных уровнях гидратации ткани.

Интересно отметить, что при достигнутых уровнях контракции ткани (8–15%), наблюдалось существенное ослабление рассеяния света тканью. На рисунке 5.6 представлены оценки коэффициента ослабления $\mu_{t\perp}$ (см. раздел 4.1.4) для образцов в исходном состоянии, для облученных областей образцов, повергнутых иммерсионному просветлению в 87% ПЭГ, фотосшиванию и регидратации, и необлученных областей этих образцов. Коэффициент ослабления оценивался по наклону зависимости ОКТ-сигнала от глубины [169]. Для всех образцов зависимость логарифма сигнала ОКТ от глубины хорошо аппроксимировалась прямой линией, что позволяло достаточно точно оценить коэффициент ослабления. Как видно из рис. 5.6 для облученных областей, то есть для областей с контракцией ткани, коэффициент ослабления оказался в среднем почти в 2 раза меньше, чем для необлученных областей. Примерная

упаковка фибрилл в ткани при уровнях гидратации, характерном нативным образцам, и образцам с контракцией, сравнивается на рисунке 5.7.

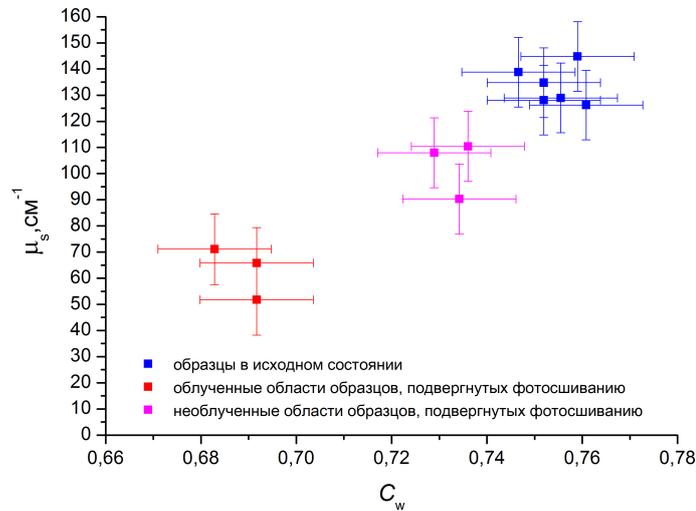
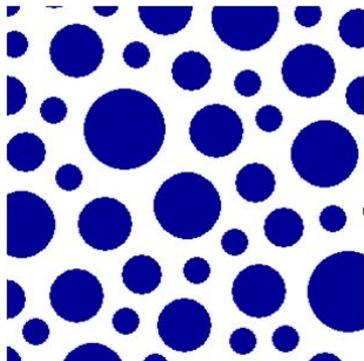
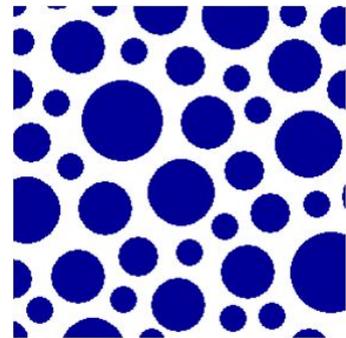


Рисунок 5.6. Коэффициент ослабления ткани в облученных областях образцов, повергнутых иммерсионному просветлению в 87% ПЭГ, фотосшиванию и регидратации, и в необлученных областях этих образцов. Также приведены данные для этих образцов в исходном состоянии.



(а) $H_V = 2,69$, $c_w = 0,73$, $H_{fb} = 0,64$



(б) $H_V = 2,2$, $c_w = 0,69$, $H_{fb} = 0,64$

Рисунок 5.7. Примерная упаковка фибрилл в необлученных областях (а) и облученных областях (б) образцов после их регидратации.

5.3 Заключение к главе 5

Таким образом, результаты, представленные в данной главе, позволяют утверждать, что рибофлавин/УФ кросслинкинг ткани в дегидратированном состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным. Установлен предельный уровень гидратации ткани при фотосшивании, при котором происходит фикси-

рование контрактированного состояния ткани после рибофлавин/УФ кросслинкинга, и оценена степень результирующей контракции ткани как функция степени гидратации ткани во время фотосшивания.

Заключение

В заключение приведем основные результаты настоящей работы:

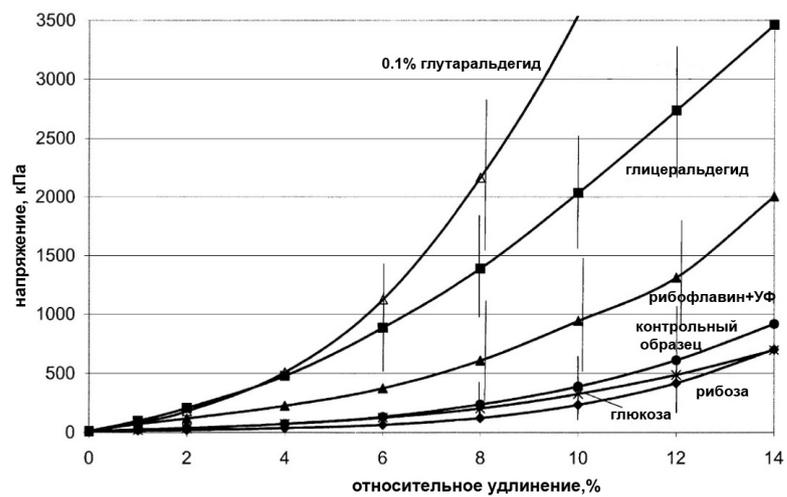
1. Исследовано влияние различных иммерсионных агентов, таких как 85%, 63,8% и 42,5% водные растворы глицерина, 40% и 54% водные растворы глюкозы, полиэтиленгликоль ПЭГ-300, на пропускание света склерой в ближней ультрафиолетовой области. Показано, что использование 85% раствора глицерина приводит к наибольшему увеличению коллимированного пропускания склеры в диапазоне длин волн 360–370 нм.
2. Проведены оценочные биомеханические измерения, направленные на изучения влияния предварительного иммерсионного просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания склеры; отмечена тенденция к увеличению жесткости образца фотосшитого в условиях предварительного иммерсионного просветления.
3. Установлено, что для приповерхностных (с глубиной залегания до 80 мкм) областей образцов нативной свиной склеры в условиях двухфотонного возбуждения флуоресценции излучением с длиной волны 760 нм функции затухания флуоресценции могут сильно различаться в зависимости от локализации зондируемого участка, но средние нормированные функции затухания флуоресценции, полученные усреднением по нескольким участкам на одной глубине, приблизительно одинаковы для разных глубин образца и разных образцов, что свидетельствует об однородности склеральной ткани на глубине до 80 мкм.
4. Разработан и апробирован метод оценки вклада флуоресценции рибофлавина и флуоресцирующих продуктов фотолиза рибофлавина в регистрируемый сигнал флуоресценции склеры в процессе ее фотосшивания, основанный на декомпозиции функции затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям, соответствующим различным компонентам системы.

5. Установлено, что иммерсионное оптическое просветление склеры способно значительно увеличить интенсивность генерации активных форм рибофлавина, участвующих в образовании сшивок.
6. Разработана ОКТ-методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани. Показано, что эта методика может быть применена для мониторинга состояния коллагенсодержащих тканей при их дегидратации и регидратации.
7. Разработана ОКТ-методика, позволяющая оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации. С помощью этой методики исследованы особенности воздействия различных иммерсионных агентов (водных растворов глицерина, ПЭГ-300, пропиленгликоля и глюкозы, а также Омнипак) на коллагеновые пучки.
8. Проведены измерения характеристик двулучепреломления коллагеновых волокон в нативном состоянии, в условиях их частичной дегидратации и иммерсионного просветления. На основе результатов этих измерений проведена оценка изменения содержания воды в фибриллах и интерстициальной жидкости при дегидратации и регидратации ткани.
9. Показано, что рибофлавин/УФ кросслинкинг ткани в дегидратированном под действием иммерсионных агентов состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным. Был установлен предельный уровень гидратации ткани при фотосшивании, при котором происходит фиксирование контрактированного состояния ткани (сухожильного пучка) после рибофлавин/УФ кросслинкинга, и оценена степень результирующей контракции ткани как функция степени гидратации ткани во время фотосшивания.
10. Показана принципиальная возможность достаточно точного поляризационно-микроскопического картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых (до 2 мм толщиной) образцах тканей, таких как склера, без секционирования, при применении техники иммерсионного просветления ткани (см. приложение Б). Выявлены условия, при которых поляризационное картографирование способно обеспечить достаточно точные оценки параметров ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах.

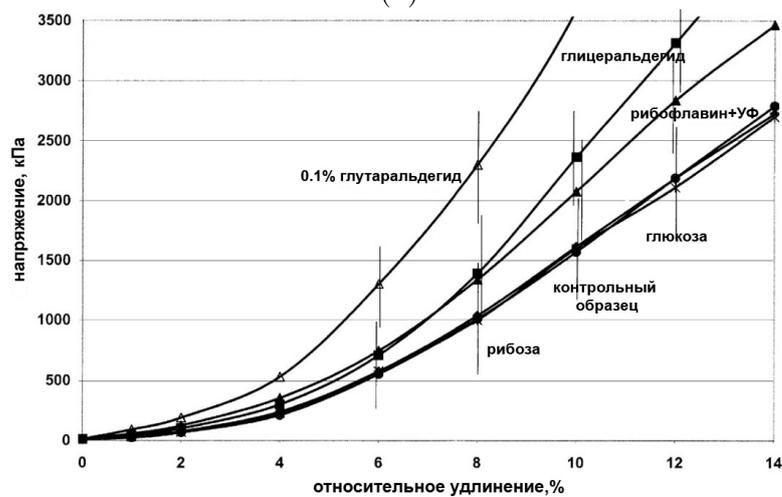
Приложения

Приложение А

Дополнительные рисунки и таблицы



(а)



(б)

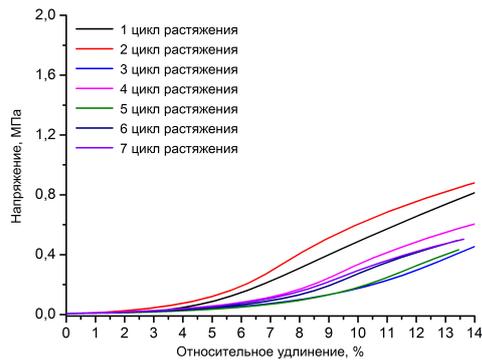
Рисунок А.1. Эффективность различных методов кросслинкинга для образцов склеры свиньи (а) и человека (б) [1].

Таблица А.1. Значения механического напряжения и модуля Юнга при 8% относительном удлинении для образцов склеры свињи и человека [1].

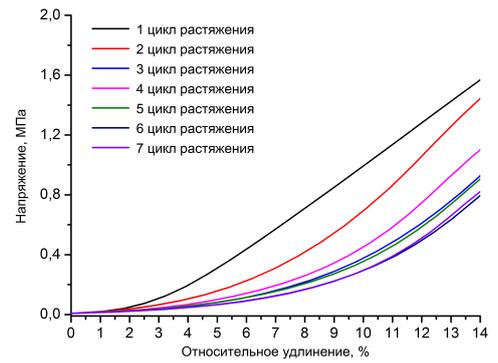
	для склеры свињи		для склеры человека	
	напряжение при 8% удлинении, Па	модуль Юнга при 8% удлинении, Па	напряжение при 8% удлинении, Па	модуль Юнга при 8% удлинении, Па
в нативном состоянии	$236,8 \pm 179,5 \times 10^3$	$5,95 \times 10^6$	$1037,3 \pm 477,6 \times 10^3$	$22,82 \times 10^6$
после обработки глутаральдегидом	$2166 \pm 927 \times 10^3$	$52,76 \times 10^6$	$2300 \pm 448 \times 10^3$	$54,69 \times 10^6$
после обработки глицеральдегидом	$1388 \pm 433 \times 10^3$	$30,88 \times 10^6$	$1388 \pm 822 \times 10^3$	$33,26 \times 10^6$
после обработки рибофлавином/УФ	$608 \pm 319 \times 10^3$	$14,63 \times 10^6$	$1338 \pm 453 \times 10^3$	$29,91 \times 10^6$

Таблица А.2. Групповой показатель преломления рассматриваемых иммерсионных агентов для $\lambda_0 = 930$ нм.

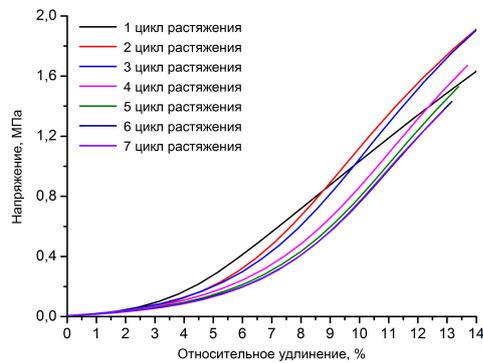
Вещество	$n_g, \pm 0,0015$
91% раствор ПЭГ-300	1,4612
82,3% раствор глицерина	1,4592
58,1% раствор глицерина	1,4247
41,2% раствор глицерина	1,4004
20,6% раствор глицерина	1,3710
Омнипак-300	1,4504
89% раствор пропиленгликоля	1,4299
40% раствор глюкозы	1,3990



(а)



(б)



(в)

Рисунок А.2. Зависимость относительного удлинения от механического напряжения для склеры кролика при многократном растяжении для образца (а) в нативном состоянии, (б) после рибофлавина/УФ фотосшивания и (в) после рибофлавина/УФ фотосшивания с предварительным просветлением в 85% растворе глицерина.

Таблица А.3. Изменение параметров трех образцов коллагеновых пучков при их иммерсионном просветлении в 82,3% растворе глицерина

No	d_0 , мм	$n_{t0} \pm 0,004$	t_{DH} , мин	$k_{ss} \pm 0,02$				$n_t \pm 0,004$	
				t_{DH}	20 мин	100 мин	1 день	t_{DH}	1 день
1	0,376	1,431	$8,2 \pm 3,5$	0,515	0,526	0,648	1,139	1,535	1,498
2	0,364	1,420	$10,7 \pm 3,1$	0,510	0,522	0,600	1,098	1,537	1,502
3	0,314	1,414	$9,5 \pm 3,6$	0,522	0,540	0,675	1,211	1,533	1,498

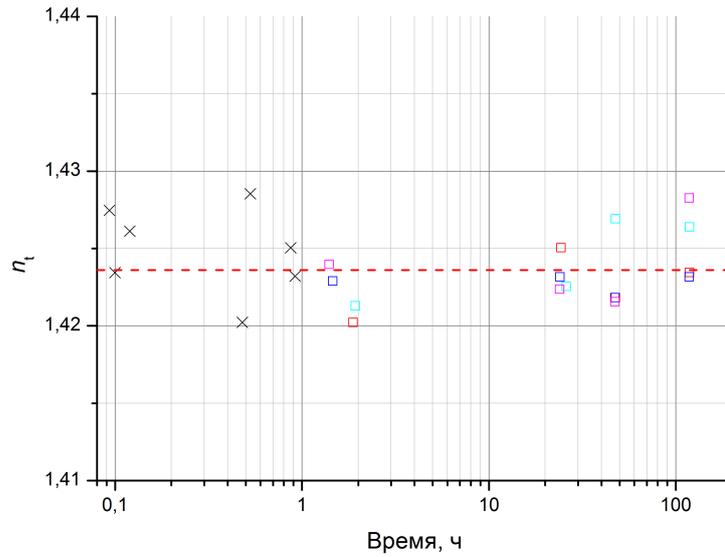


Рисунок А.3. Вариация измеренного значения среднего группового показателя преломления ткани n_t образцов в нативном состоянии со временем и от образца к образцу. По оси абсцисс отложено время выдерживания образца в физиологическом растворе. Квадратиками одинакового цвета показаны данные для одного и того же образца. Крестиками показаны данные для различных образцов. Красная пунктирная линия показывает среднее значение n_t , рассчитанное по всем экспериментальным точкам, представленным на этом графике.

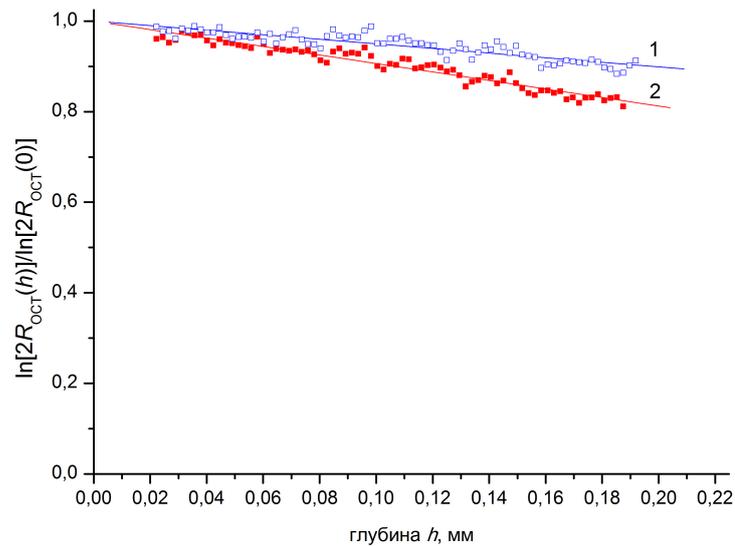


Рисунок А.4. Зависимости ОКТ-сигнала от глубины для образца сухожильного пучка, полученные при ориентации плоскости преимущественной поляризации зондирующего излучения перпендикулярно (1) и параллельно (2) оси сухожильного пучка. Экспериментальные точки получены усреднением данных по пяти А-сканам.

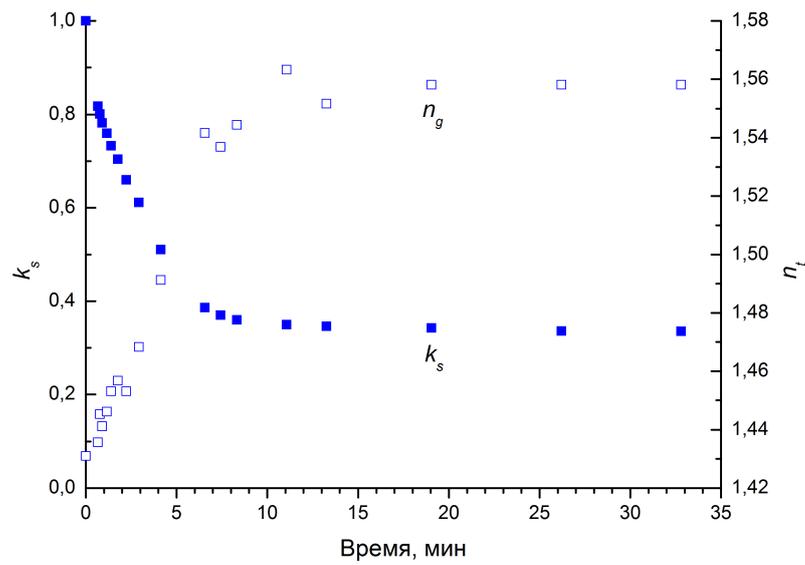


Рисунок А.5. Кинетика коэффициента изменения объема k_s и среднего группового показателя преломления ткани n_t образца вторичного коллагенового пучка при его дегидратации в воздухе при комнатной температуре.

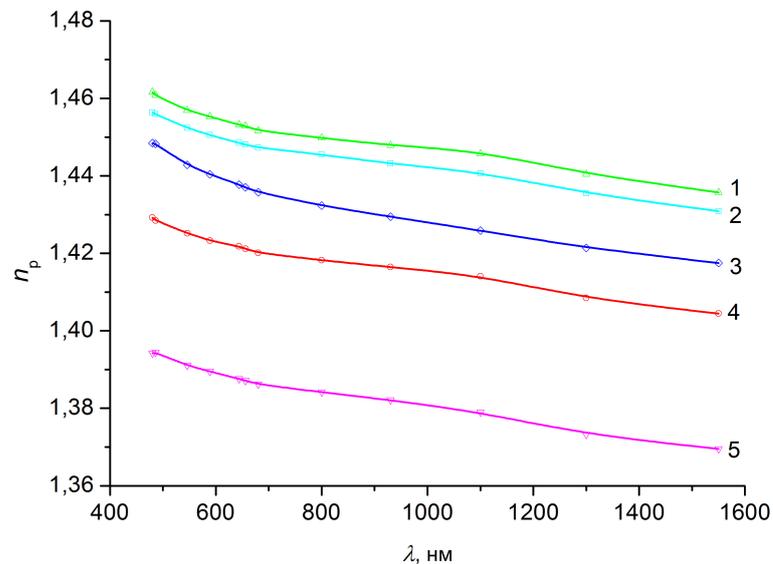
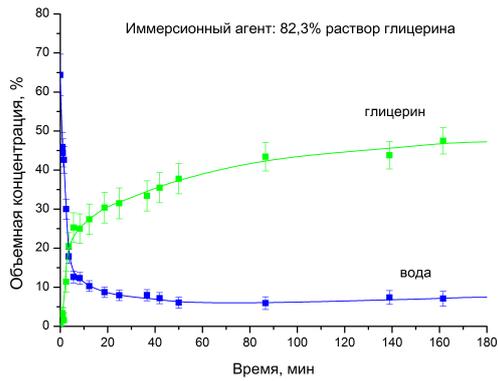
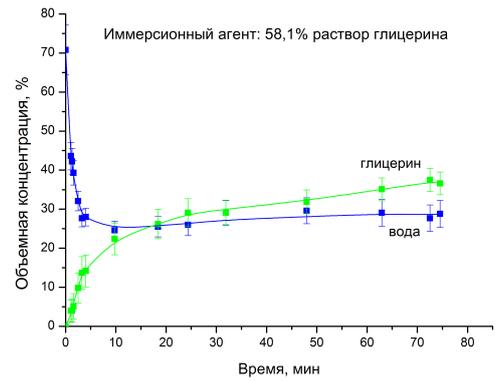


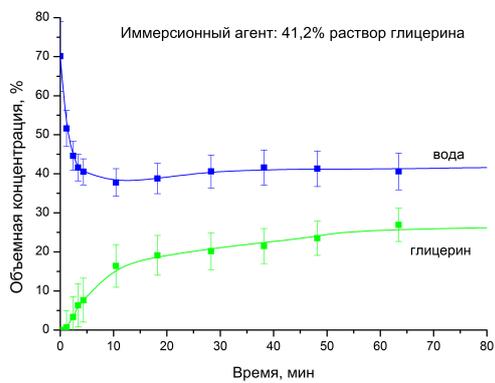
Рисунок А.6. Зависимость фазового показателя преломления n_p используемых иммерсионных агентов от длины волны λ : 1 – 91% раствор ПЭГ-300, 2 – 82,3% раствор глицерина, 3 – Омнипак-300, 4 – 89% раствор пропиленгликоля, 5 – 40% раствор глюкозы. Погрешность измерений составляет порядка 0,0003 (SEM).



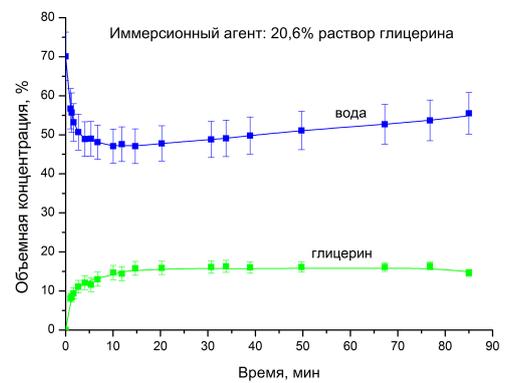
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок А.7. Изменение объемной концентрации глицерина и воды в ткани с момента погружения образца в иммерсионную жидкость для образцов, просветлявшихся в 82,3% растворе глицерина (а), 58,1% растворе глицерина (б), 41,2% растворе глицерина (в) и 20,6% растворе глицерина (г).

Приложение Б

Характеризация коллагенсодержащих тканей методами поляризационной микроскопии

При изучении биомеханики и аномальных состояний таких тканей, как склера, принципиально важна информация об ориентационной упорядоченности коллагеновых волокон в ткани и ее пространственной вариации. Для характеристики архитектуры коллагенсодержащих тканей на макро- и мезоуровнях и построения карт ориентации коллагеновых волокон в настоящее время используются рентгеноструктурные методы, многофотонная микроскопия, оптические дифракционные методы и поляризационная микроскопия [18, 227–229]. Среди преимуществ, предоставляемых методами поляризационной микроскопии, отмечают широкое поле захвата данных и хорошее разрешение [18].

Многие биологические ткани проявляют двулучепреломление. Двулучепреломляющие компоненты присутствуют в мышечной ткани, костной ткани, в сухожилиях, хряще, роговом слое эпидермиса, дерме, роговице, склере, нервной ткани и т.д. [169, 230]. Двулучепреломление биологической ткани указывает на наличие ориентационной упорядоченности ее структурных элементов на уровне молекул и надмолекулярных агрегатов. Двулучепреломление компонентов биологической ткани позволяет использовать для ее характеристики поляризационно-оптические методы. Наиболее долгую историю применения к биологическим тканям имеет трансмиссионная поляризационная микроскопия (ТПМ). В течение многих десятилетий она используется для изучения структуры биотканей, характеристики их физиологического состояния и мониторинга биологических процессов. В настоящее время ТПМ продолжает широко использоваться в биологии и медицине наряду с другими эффективными и разнонаправленными поляризационными методами (поляризационно-чувствительная ОКТ, макроскопическое поляризационное картографирование с использованием матриц Мюллера (ММ-картографирование), поляризационная спектроскопия и т.д.). Современные методы поляризационной микроскопии широко используют возможность получения цифровых изображений и компьютерной обработки данных. Высокоапертурная ТПМ используется, главным образом, для визуализации клеточных и внеклеточных элементов микронных и субмикронных размеров и работает с очень тонкими образцами. Низкоапертурная ТПМ используется для характеристики тканей на макроуровне. Толщина образцов для низкоапертурной ТПМ обычно составляет около 30 мкм.

Практика показывает, что при рассмотрении сильно рассеивающих тканей, какой является строма склеры в нативном состоянии, ТПМ картографирование применимо к образцам, чья толщина не превышает 100–120 мкм; при большей толщине образца надежные результаты не могут быть получены из-за сильного многократного рассеяния. Обычно информация об ориентации коллагеновых волокон требуется для ткани как целого, при ее толщине от 400 до 2000 мкм. Применение секционирования ткани в таких случаях делает процедуру измерений очень трудоемкой. Кроме того, при изготовлении срезов может быть нарушена ориентация коллагеновых волокон. В ходе выполнения данной диссертационной работы были проведены исследования, показавшие принципиальную возможность достаточно точного поляризационно-микроскопического картографирования ориентации коллагена в толстых (до 2 мм толщиной) образцах тканей, таких как склера, без секционирования, при применении техники иммерсионного просветления ткани. Также были выявлены условия, при которых поляризационное картографирование способно дать достаточно точные оценки параметров ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах, и найдены способы обеспечения выполнения этих условий для образцов склеры. Результаты этих исследований представляются в данном приложении и разделах 4.3.3 и 4.3.5 главы 4 и были опубликованы в работах [202, 203, 205, 231, 232].

Б.1 Двулучепреломление коллагенсодержащих тканей

В качестве базового двулучепреломляющего элемента ткани может рассматриваться коллагеновое волокно, как система ориентационно упорядоченных фибрилл. Коллагеновое волокно имеет положительное двулучепреломление и оптическую ось, направленную вдоль его продольной оси. В настоящем исследовании рассматриваются макроскопические локальные характеристики двулучепреломления ткани, макроскопическая оптическая ось (ее направление указывается единичным вектором \mathbf{c}) и макроскопические главные показатели преломления (n_{\parallel} и n_{\perp}), которые по определению ассоциируются с достаточно большими элементарными объемами, размерами порядка десятков микрон, через которые проходит большое число по-разному ориентированных коллагеновых волокон. Использование этих макроскопических параметров приводит к рассмотрению системы коллагеновые пучки – внутритканевая жидкость (коллагенового матрикса) как сплошной оптически анизотропной среды. При экспериментальной оценке параметров двулучепреломления коллагенсодержащих тканей эта модель, явно или неявно, используется в большинстве случаев. Применение этой

модели оправдано в ситуациях, когда можно пренебречь многократным рассеянием на коллагеновых волокнах.

Направление макроскопической оптической оси, ассоциируемой с данным элементарным объемом ткани, определяется направлением преимущественной ориентации коллагеновых волокон в пределах этого объема, а величина коэффициента двулучепреломления $\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$ зависит от степени ориентационной упорядоченности коллагеновых волокон в этом объеме. Последнее позволяет оценивать степень ориентационного порядка волокон по экспериментальным значениям Δn [233]. Величина Δn пропорциональна объемной концентрации коллагеновых волокон в ткани. При иммерсионном просветлении нативных коллагенсодержащих тканей величина Δn значительно уменьшается. Это объясняют уменьшением вклада анизотропии формы в полное двулучепреломление Δn . В литературе отмечается, что при использовании чистого глицерина в качестве просветляющего агента данный эффект максимален [222, 234].

Исходя из сказанного выше, при анализе результатов низкоапертурного поляризационного картографирования можно рассматривать в качестве модели коллагенового матрикса просветленных склеры и дермы слой локально одноосной среды с пространственной зависимостью локальной оптической оси вида

$$\mathbf{c} = \begin{pmatrix} c_x \\ c_y \\ c_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \varphi(x, y, z) \\ \sin \varphi(x, y, z) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{Б.1})$$

где φ – угол между оптической осью и осью x декартовой системы координат (x, y, z) с осью z , направленной перпендикулярно поверхности ткани. При рассмотрении толстых слоев должна учитываться вариация \mathbf{c} по z . Одной из целей проведенных исследований была оценка возможности с помощью низкоапертурного поляризационного картографирования оценить с хорошей точностью параметры ориентации коллагеновых волокон в толстых слоях дермы и склеры, учитывая то, что \mathbf{c} зависит от z (см. раздел Б.4).

Б.2 Картируемые оптические характеристики

Используемый в данной работе метод поляризационного картографирования – он детально описан в диссертации [235], а общий подход, лежащий в его основе, нашел отражение в работах [236–238] – основан на схеме измерений "поляризатор – образец – анализатор" и ориентирован на следующие условия исследования образцов биотканей: образец хорошо про-

светленной ткани находится в иммерсионной жидкости между предметным и покровным стеклом и наблюдается с помощью поляризационного микроскопа; образец освещается почти параллельным пучком; объектив микроскопа имеет малую числовую апертуру. Изображения образца при квазимонохроматическом освещении регистрируются видеокамерой.

В данном рассмотрении предполагается, что локальное регистрируемое пропускание образца может быть описано с помощью матрицы Мюллера $\mathbf{M} = [m_{ij}] (i, j = 1, 2, 3, 4)$, связывающей вектор Стокса света, падающего на образец, и вектор Стокса компоненты света, выходящего из рассматриваемого малого участка образца, которая попадает в объектив микроскопа и участвует в построении изображения этого участка. Обозначим эту компоненту \mathcal{W} . Когда измерения осуществляются без использования фазовых пластин, а только с линейным поляризатором и линейным анализатором, для того чтобы описать, как регистрируемая интенсивность зависит от ориентации поляризатора и анализатора, удобно использовать понятие поляризационного коэффициента передачи [236, 239], который в данном случае может быть определен следующим образом. Пусть ϑ и ϑ' – углы ориентации осей пропускания поляризатора и анализатора, соответственно, измеряемые от оси x декартовой системы координат (x, y, z) (см. рис. Б.1(а) и Б.1(б)), и пусть $\bar{\vartheta}$ и $\bar{\vartheta}'$ – произвольные значения ϑ и ϑ' . Поляризационный коэффициент передачи рассматриваемой малой области образца для $\vartheta = \bar{\vartheta}$ и $\vartheta' = \bar{\vartheta}'$ определяется как

$$t_{PA}(\bar{\vartheta}, \bar{\vartheta}') = I_{W\bar{\vartheta}}(\bar{\vartheta}) / I_{\text{inc}} \quad (\text{Б.2})$$

где $I_{W\bar{\vartheta}}(\bar{\vartheta})$ – интенсивность линейно поляризованной, с направлением колебаний под углом $\bar{\vartheta}'$ относительно оси x , компоненты \mathcal{W} при $\vartheta = \bar{\vartheta}$; I_{inc} – интенсивность падающего света. Зависимость t_{PA} от ϑ и ϑ' может быть выражена следующим образом:

$$\begin{aligned} t_{PA}(\vartheta, \vartheta') &= \tilde{B}_0 + \tilde{B}_1 \cos \eta^- + \tilde{B}_2 \cos \eta^+ + \tilde{B}_3 \sin \eta^- + \tilde{B}_4 \sin \eta^+ \\ &+ \tilde{B}_5 \cos 2\vartheta + \tilde{B}_6 \sin 2\vartheta + \tilde{B}_7 \cos 2\vartheta' + \tilde{B}_8 \sin 2\vartheta' \\ \eta^- &= 2(\vartheta - \vartheta'), \quad \eta^+ = 2(\vartheta + \vartheta'), \end{aligned} \quad (\text{Б.3})$$

где

$$\begin{aligned} \tilde{B}_0 &= m_{11}/2, \quad \tilde{B}_1 = (m_{22} + m_{33})/4, \quad \tilde{B}_2 = (m_{22} - m_{33})/4, \\ \tilde{B}_3 &= (m_{23} - m_{32})/4, \quad \tilde{B}_4 = (m_{23} + m_{32})/4, \\ \tilde{B}_5 &= m_{12}/2, \quad \tilde{B}_6 = m_{13}/2, \quad \tilde{B}_7 = m_{21}/2, \quad \tilde{B}_8 = m_{31}/2 \end{aligned} \quad (\text{Б.4})$$

Относительно коэффициентов \tilde{B}_j можно отметить следующее. Отношение интенсивности \mathcal{W} к интенсивности падающего света было бы равно $2\tilde{B}_0$, если бы падающий свет был неполяризованным. В отсутствие естественной оптической активности (в дальнейшем мы прене-

брегаем естественной оптической активностью компонентов ткани, так как она практически не влияет на измеряемые величины в рассматриваемой ситуации [240]) для оптически изотропных сред коэффициенты с \tilde{B}_2 по \tilde{B}_8 равны нулю. Если интенсивность \mathcal{W} не зависит от состояния поляризации падающего света (т.е. при отсутствии поляризационно-зависимых потерь), коэффициенты с \tilde{B}_5 по \tilde{B}_8 равны нулю. В отсутствие поляризационно-зависимых потерь, что характерно хорошо просветленным тканям, выражение (Б.3) принимает вид

$$t_{PA}(\vartheta, \vartheta') = \tilde{B}_0 + \tilde{B}_1 \cos 2(\vartheta - \vartheta') + \tilde{B}_2 \cos 2(\vartheta + \vartheta') + \tilde{B}_3 \sin 2(\vartheta - \vartheta') + \tilde{B}_4 \sin 2(\vartheta + \vartheta') \quad (\text{Б.5})$$

В настоящем рассмотрении особый интерес представляют три характеристических угла ν , ϕ , Δ_r определяемые соотношениями

$$\cos 4\nu = \tilde{B}_2 / \sqrt{\tilde{B}_2^2 + \tilde{B}_4^2}, \quad \sin 4\nu = \tilde{B}_4 / \sqrt{\tilde{B}_2^2 + \tilde{B}_4^2}, \quad (\text{Б.6})$$

$$\cos 2\phi = \tilde{B}_1 / \sqrt{\tilde{B}_1^2 + \tilde{B}_3^2}, \quad \sin 2\phi = -\tilde{B}_3 / \sqrt{\tilde{B}_1^2 + \tilde{B}_3^2}, \quad (\text{Б.7})$$

$$\Delta_r = 2 \arccos \sqrt{\sqrt{\tilde{B}_1^2 + \tilde{B}_3^2} / \left(\sqrt{\tilde{B}_1^2 + \tilde{B}_3^2} + \sqrt{\tilde{B}_2^2 + \tilde{B}_4^2} \right)}. \quad (\text{Б.8})$$

Для поляризационных систем без потерь углы ν и ϕ определяют ориентацию так называемых первичной и вторичной характеристических осей [241, 242]. Из (Б.5) следует, что коэффициент передачи $t_{PA}(\vartheta, \vartheta')$ достигает своего максимального значения при $(\vartheta + \vartheta') / 2 = \nu$ и $\vartheta' - \vartheta = \phi$, то есть углы ν и ϕ описывают ориентацию поляризатора и анализатора, при которой рассматриваемая область выглядит наиболее светлой (см. рис. Б.1(в)). Ось, параллельную плоскости образца и составляющую угол ν с осью x , мы будем условно называть срединной поляризационной осью. В соответствии с (Б.3) для любой области всегда можно указать две взаимно перпендикулярные срединные поляризационные оси (если $\nu = \nu_0$ удовлетворяет (Б.6), то $\nu = \nu_0 + \pi/2$ также является решением (Б.6)). Заметим, что углы ϕ и Δ_r для какой-либо области инвариантны относительно любых азимутальных поворотов этой области.

Если в качестве образца выступает слой анизотропной локально одноосной среды, для однородных областей слоя, а также неоднородных анизотропных областей без азимутальной вариации локальной оптической оси по толще слоя $\phi = 0$, срединные поляризационные оси ориентированы вдоль медленной и быстрой осей данной области, а характеристический угол

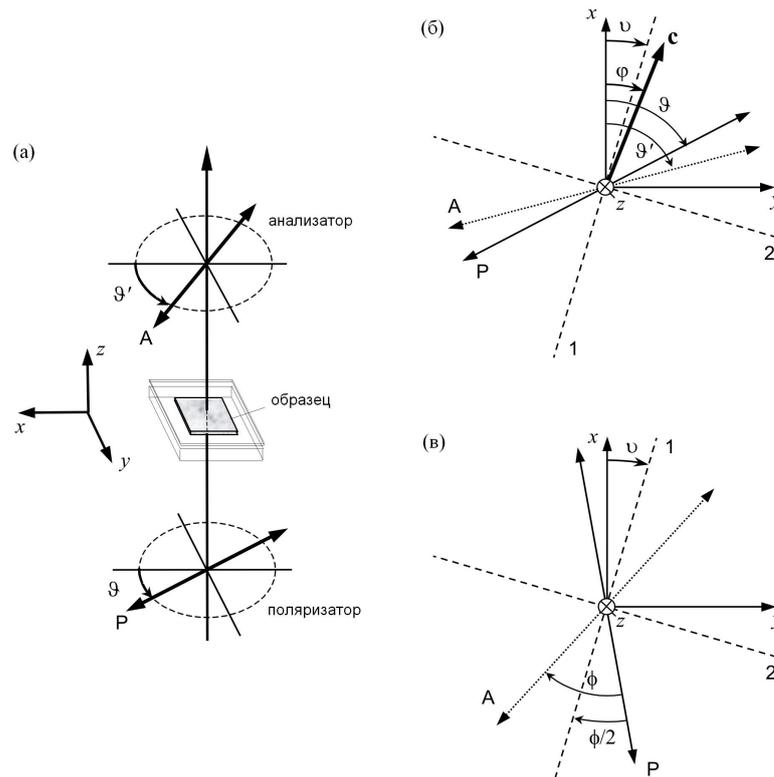


Рисунок Б.1. (а) Геометрия эксперимента. P и A – оси пропускания поляризатора и анализатора, соответственно. (б) Спецификация ориентации поляризатора, анализатора, поляризационных срединных осей (1 и 2) и оптической оси c . (в) Ориентация поляризатора и анализатора, при которой достигается наиболее яркое изображение рассматриваемой области.

Δ_r связан с фазовой задержкой δ в данной области следующим образом:

$$\Delta_r = 2 \arccos (|\cos (\delta/2)|) \quad (\text{Б.9})$$

Это соотношение также имеет силу для областей с малой азимутальной вариацией локальной оптической оси по толще слоя, в котором свет распространяется в квазиadiaбатическом режиме [243, 244], в этом случае δ является суммарной фазовой задержкой в этой области. В обоих этих случаях, а также при реализации режима распространения света, рассматриваемого в разделе Б.4, одна из поляризационных срединных осей точно (если $\phi = 0$) или приблизительно указывает направление преимущественной ориентации локальной медленной оси по всей толще образца. Эту ось мы будем называть медленной срединной осью, вторую – быстрой срединной осью. В случае биотканей, таких как склера и дерма, ориентация срединных осей по площади ткани меняется непрерывно везде или почти везде, поэтому для дифференциации медленная срединная ось – быстрая срединная ось по всей площади картографирования, достаточно экспериментально установить, какая из поляризационных срединных осей является медленной, в одной или нескольких точках картографируемой области. Это может быть сделано с помощью фазового компенсатора в областях с малыми значениями ϕ (см. напр. [245]). Этот способ использовался в данной работе.

Следует отметить, что ненулевые значения ϕ всегда указывают на наличие структурной хиральности среды ($\phi = 0$ для оптических систем с плоскостью симметрии или центром симметрии), и во многих ситуациях этот характеристический угол может быть использован в качестве количественной меры степени проявления структурной хиральности образца в его оптических свойствах (в наблюдаемой оптической хиральности). В настоящем исследовании мы используем картографирование ϕ для оценки степени и характера влияния азимутальных вариаций локальной оптической оси по толще образца – единственного фактора, который может приводить к оптической хиральности в нашем случае, – на оптические свойства образца.

Б.3 Экспериментальная методика и оборудование

Измерительная часть используемой в данной работе системы поляризационного картографирования собрана на базе поляризационного микроскопа ПОЛАМ Л-213. Образец освещается светом от осветительной лампы микроскопа, пропущенным через узкополосный (интерференционный) светофильтр, выделяющим нужную квазимонохроматическую компоненту. Для регистрации изображений использовалась измерительная 12-битная видеокамера

Видеоскан-285/П-2001. Особенности регистрации и обработки изображений в этой системе описаны в [235, 246]. В системе применяется специальный способ регистрации изображений, позволяющий учитывать при обработке флуктуации интенсивности источника и темнового сигнала камеры. Кроме того, при обработке первичных изображений вносятся поправки, учитывающие то, что свет, падающий на поляризатор микроскопа, является частично поляризованным, а также поперечное смещение изображения при повороте анализатора. По изображениям образца, полученным при различных ориентациях поляризатора и анализатора, рассчитываются карты параметров, характеризующих зависимость регистрируемой интенсивности изображения от ориентации поляризатора и анализатора, и затем, по ним, карты характеристических углов ν , ϕ и Δ_r .

При обработке нами использовалось следующее выражение для интенсивности изображения $i_I(\vartheta, \vartheta')$:

$$i_I = B_0 + B_1 \cos \eta^- + B_2 \cos \eta^+ + B_3 \sin \eta^- + B_4 \sin \eta^+ + B_5 \cos 2\vartheta + B_6 \sin 2\vartheta + B_7 \cos 2\vartheta' + B_8 \sin 2\vartheta' \quad (\text{Б.10})$$

(ср. (Б.3)). В случае квазимонохроматического освещения коэффициенты B_j ($j = 0, 1, \dots, 8$) могут быть выражены как

$$B_j = \tilde{B}_j(\tilde{\lambda}) K I_0, \quad (\text{Б.11})$$

где I_0 – интенсивность света, падающего на образец, K – некоторый аппаратный коэффициент, $\tilde{\lambda}$ – средняя длина волны падающего света. Получение карт коэффициентов B_j составляет первый этап картографирования. Карты коэффициентов B_j рассчитывались с помощью метода наименьших квадратов по 16 снимкам исследуемого образца, полученным при $\vartheta = -45^\circ, 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ и $\vartheta' = -45^\circ, 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$. Характеристические углы ν , ϕ и Δ_r вычислялись по формулам (Б.6)–(Б.8) с \tilde{B}_j замененными на B_j .

Для оценки применимости представления (Б.10) и точности результатов картографирования нами использовался следующий параметр:

$$\varepsilon_{te} = \frac{\left\langle \sqrt{\frac{1}{16} \sum_{k=1}^{16} (i_{kte} - i_{ke})^2} \right\rangle}{2 \langle B_0 \rangle} \quad (\text{Б.12})$$

где угловые скобки обозначают попиксельное усреднение по картографируемой области, i_{kte} – значение интенсивности пикселя в k -ом снимке, рассчитанное через полученные коэффициенты B_j по формуле (Б.10), и i_{ke} – интенсивность того же пикселя в соответствующем откорректированном экспериментальном снимке.

Большинство измерений, результаты которых представлены в данном приложении, были сделаны с $2,5\times$ объективом с числовой апертурой 0,05.

Б.4 Оценка возможности определения параметров коллагеновой структуры в толстых образцах с помощью поляризационного картографирования

Образцы

В экспериментах использовались образцы склеры крысы, склеры свиньи и кожи крысы, просветленные в 82,3% или в 41,2% водном растворе глицерина.

Перед процедурой оптического просветления образцы склеры механически очищались от сосудистой оболочки и сетчатки. Образцы склеры свиньи также были очищены от эписклеральной ткани с наружной стороны. Образцы кожи (со спины и живота) очищались от жировой ткани и волос. После очистки образцы помещались в 82,3% или 41,2% водный раствор глицерина. Образцы склеры просветлялись в 82,3% растворе глицерина. Для просветления образцов кожи использовался 82,3% или 41,2% водный раствор глицерина. Образцы склеры свиньи и кожи крысы выдерживались в иммерсионном агенте двое суток, образцы склеры крысы – несколько часов. После просветления образцы склеры выглядели прозрачными и бесцветными, образцы кожи – мутноватыми и чуть окрашенными. При визуальном микроскопическом наблюдении, как образцов склеры, так и дермы при скрещенных поляризаторах и ахроматическом освещении не наблюдалось очень ярких областей и интерференционной окраски, что свидетельствовало о том, что обусловленная двулучепреломлением фазовая задержка значительно меньше 180° по всей площади образца. Оценки оптической разности хода для этих образцов, сделанные с помощью компенсатора Бабиня, подтвердили это.

Для микроскопических измерений образцы помещались в раствор глицерина между предметным и покровным стеклами.

Экспериментальные результаты и обсуждение

На рисунках **Б.2** и **Б.3** показаны типичные результаты поляризационного картографирования для образцов склеры свиньи, склеры крысы и кожи крысы. На рисунке **Б.2** показаны карты ориентации поляризационных срединных осей, ϕ и Δ_r для просветленной в 82,3% растворе глицерина склеры свиньи (образец 1), а также полученные оценки эффективного

показателя двулучепреломления среды, рассчитываемого как

$$\Delta n_{\text{eff}} = \frac{\Delta_r \lambda}{2\pi d} \quad (\text{Б.13})$$

где d – толщина образца, для разных участков образца. Показаны спектральные зависимости среднего по площади значения Δn_{eff} , обозначенного $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$, для трех маленьких участков, выделенных на картах желтыми прямоугольниками, а также для всей области картографирования. На рисунке Б.3 показаны карты ϕ для различных длин волн и соответствующие функции распределения ϕ для образца 1, образца склеры крысы, просветленного в 82,3% растворе глицерина (образец 2), и двух образцов кожи крысы, один из которых просветлен в 41,2% растворе глицерина (образец 3), а другой – в 82,3% растворе глицерина (образец 4). Для всех случаев показаны среднее значение и максимальное значение Δ_r по картографируемой области. Во всех случаях величина ε_{te} не превысила $1,5 \times 10^{-2}$; в большинстве случаев она была меньше 1×10^{-2} . Коллимированное пропускание для образца склеры свиньи составило 19–40%, для образца склеры крысы около 80%, для образца кожи крысы, просветленной в 41,2% растворе глицерина, 7–14%, для образца кожи крысы, просветленной в 82,3% растворе глицерина, 4–9%.

Обсуждение этих рисунков уместно начать с рассмотрения одномерного аналога оптической задачи, с которой мы имеем дело.

Рассмотрим систему из N фазовых пластин с суммарной фазовой задержкой $G = \delta_1 + \delta_2 + \dots + \delta_N$, где $\delta_j = h_j G$ – фазовая задержка j -той пластины ($h_1 + h_2 + \dots + h_N = 1$). Пусть свет падает на систему в нормальном направлении, вдоль оси z системы отсчета (x, y, z) , последовательно проходя через пластины с номерами 1, 2 и т.д. Используя унитарное унитарное представление матриц Джонса, мы можем выразить матрицу Джонса системы пластин, отнесенную к базису (x, y) , следующим образом

$$\mathbf{P} = \mathbf{P}_N \mathbf{P}_{N-1} \cdot \dots \cdot \mathbf{P}_2 \mathbf{P}_1 \quad (\text{Б.14})$$

где

$$\mathbf{P}_j = \begin{pmatrix} \cos(Gh_j/2) + i \sin(Gh_j/2) \cos 2\varphi_j & i \sin(Gh_j/2) \sin 2\varphi_j \\ i \sin(Gh_j/2) \sin 2\varphi_j & \cos(Gh_j/2) - i \sin(Gh_j/2) \cos 2\varphi_j \end{pmatrix} \quad (\text{Б.15})$$

Здесь φ_j – это угол между медленной осью j -той фазовой пластины и осью x .

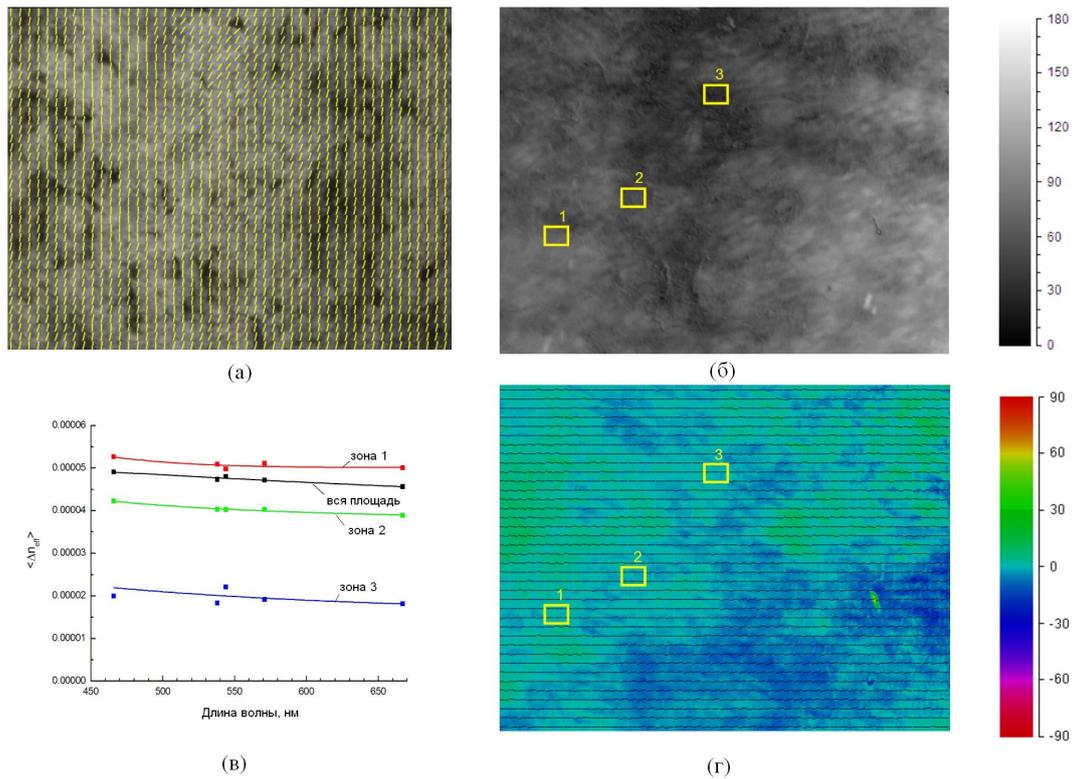


Рисунок Б.2. Результаты картографирования для образца склеры свињи толщиной 1,75 мм при $\lambda = 544$ нм. (а) Карта ориентации медленной срединной оси (желтые линии), наложенная на изображение образца в неполяризованном свете. (б) Карта Δ_r . (в) Спектральные зависимости средних значений Δn_{eff} для всей области картографирования, а также зон 1, 2 и 3, показанных желтыми прямоугольниками на рисунках (б) и (г).

Квадратики показывают экспериментальные значения. (г) Карта ϕ . Ширина картографируемой области 1,54 мм.

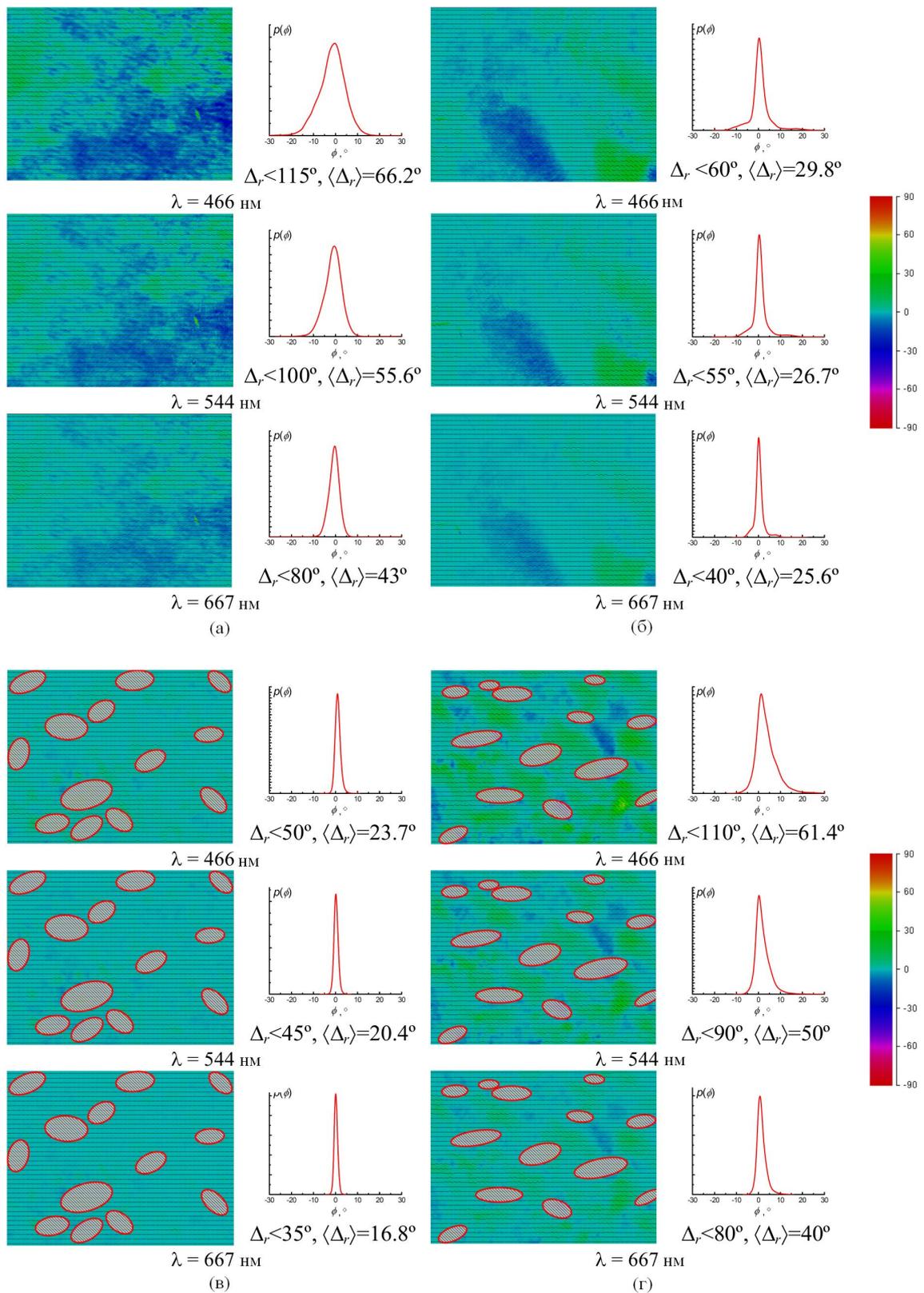


Рисунок Б.3. Карты характеристического угла ϕ и соответствующие функции распределения ϕ при различных значениях длины волны для образца 1 (склера свиньи), толщина образца 1,75 мм (а), образца 2 (склера крысы), 190 мкм (б), образца 3 (кожа крысы), 1,07 мм (в), и образца 4 (кожа крысы), 1,64 мм (г). На рисунках (в) и (г) заштрихованные эллипсы показывают области, занятые волосяными фолликулами. Ширина картографируемых областей 1,54 мм.

Предположим, что задержка G столь мала, что $\cos(G/2) \approx 1$. Тогда мы можем использовать приближения $\cos(Gh_j/2) \approx 1$ и $\sin(Gh_j/2) \approx Gh_j/2$, что приводит к следующему выражению для матриц \mathbf{P}_j :

$$\mathbf{P}_j \approx \mathbf{U} + i \frac{Gh_j}{2} \begin{pmatrix} \cos 2\varphi_j & \sin 2\varphi_j \\ \sin 2\varphi_j & -\cos 2\varphi_j \end{pmatrix} \quad (\text{Б.16})$$

где \mathbf{U} – единичная матрица. После подстановки (Б.16) в (Б.14) мы имеем

$$\mathbf{P} \approx \mathbf{U} + i \frac{G}{2} \begin{pmatrix} \sum_{j=1}^N h_j \cos 2\varphi_j & \sum_{j=1}^N h_j \sin 2\varphi_j \\ \sum_{j=1}^N h_j \sin 2\varphi_j & -\sum_{j=1}^N h_j \cos 2\varphi_j \end{pmatrix} \quad (\text{Б.17})$$

Это соотношение может быть переписано как

$$\mathbf{P} \approx \mathbf{U} + i \frac{GS}{2} \begin{pmatrix} \cos 2\chi & \sin 2\chi \\ \sin 2\chi & -\cos 2\chi \end{pmatrix} \quad (\text{Б.18})$$

где

$$S = \sqrt{\bar{X}^2 + \bar{Y}^2}, \quad \cos 2\chi = \frac{\bar{X}}{S}, \quad \sin 2\chi = \frac{\bar{Y}}{S} \quad (\text{Б.19})$$

$$\bar{X} = \sum_{j=1}^N h_j \cos 2\varphi_j, \quad \bar{Y} = \sum_{j=1}^N h_j \sin 2\varphi_j$$

Из сравнения (Б.18) и (Б.16) видно, что в рассматриваемом случае ($\cos(G/2) \approx 1$) система ведет себя как обыкновенная (эквивалентная) фазовая пластина, фазовая задержка которой равна GS и чья медленная ось ориентирована под углом χ относительно оси x . Заметим, что здесь S и χ инвариантны относительно любых перестановок фазовых пластин. Предположим, что пластины имеют одинаковый показатель двулучепреломления Δn_p и одинаковую толщину d_p ($G = 2\pi\Delta n_p d_p/\lambda$) и разделены изотропными слоями, а d – это толщина всей системы. Тогда показатель двулучепреломления Δn_{ep} эквивалентной фазовой пластины толщиной d может быть выражен как

$$\Delta n_{ep} = \Delta n_p C_p S, \quad (\text{Б.20})$$

где $C_p = d_p/d$ – "объемная доля" фазовых пластин в системе. Параметр S в этом случае является чисто геометрическим и может рассматриваться как мера ориентационного порядка фазовых пластин. Направление, специфицируемое углом χ , может рассматриваться как направление преимущественной ориентации фазовых пластин в системе. На микроуровне ана-

логами фазовых пластин системы и $\Delta n_{\text{ер}}$ являются коллагеновые волокна и эффективный показатель двулучепреломления ткани. При $\Delta n_p = 0,0015$ (грубая оценка для коллагеновых волокон в ткани, просветленной в глицерине) и $C_p = 0,2$ (кожа [247]) надежная оценка значения d , до которого система в видимом диапазоне ведет себя как одиночная фазовая пластина, – 40 мкм. Исходя из этого, можно взять 40 мкм как оптимальный линейный размер элементарного объема, с которым ассоциируются макроскопическая оптическая ось и макроскопический показатель двулучепреломления Δn , в случае просветленной ткани.

Имея дело с толстым (>100 мкм) образцом ткани, можно рассматривать его как систему подслоёв с толщинами порядка 40 мкм, предполагая, что в каждом подслое Δn и \mathbf{c} зависят от x и y , но не зависят от z . Подобный подход часто применим к толстым образцам дермы и склеры, просветленных в глицерине, так как максимальные значения макроскопического показателя двулучепреломления Δn для этих тканей значительно меньше, чем значение $\Delta n_p C_p$ в предыдущем примере. Для того чтобы получить некоторые полезные оценки для этого случая, можно немного уточнить соотношение Б.18:

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} a' + ia'' & b' + ib'' \\ -b' + ib'' & a' - ia'' \end{pmatrix} = \mathbf{U} + i \frac{GS}{2} \begin{pmatrix} \cos 2\chi & \sin 2\chi \\ \sin 2\chi & -\cos 2\chi \end{pmatrix} + O(G^2) \quad (\text{Б.21})$$

при $G \rightarrow 0$. В данном случае, фазовые пластины являются аналогами подслоев в макромодели. Характеристический угол ϕ для этой системы может быть выражен через элементы \mathbf{P} как

$$\phi = \arctan(-b'/a'). \quad (\text{Б.22})$$

Из Б.21 видно, что $b' = O(G^2)$ и $a' = 1 + O(G^2)$ при $G \rightarrow 0$, и из Б.22 получается $\phi = O(G^2)$, то есть при приближении G к нулю ϕ уменьшается пропорционально G^2 . С одной стороны это означает, что существует относительно широкий диапазон значений G , при которых значения ϕ очень малы ($\cos G \approx 1$). Назовем этот диапазон G диапазоном пренебрежимой оптической хиральности (для этого диапазона, структурная хиральность системы практически не проявляется в оптических свойствах системы) и обозначим значение G на границе этого диапазона как $G_{\text{НОС}}$. С другой стороны, вне этого диапазона ϕ быстро увеличивается с увеличением G . Рисунок Б.4 иллюстрирует эту ситуацию. На рисунке Б.4(а) показаны зависимости ϕ от G для 20 случайно сгенерированных четырехслойных структур. Исходя из этого рисунка, можно взять $G_{\text{НОС}} = 20^\circ$. Рисунки Б.4(б) и Б.4(в) показывают, насколько точно могут быть определены преимущественная ориентация пластин и фазовая задержка GS для этих систем при использовании оценок $v \approx \chi$ (здесь и далее предполагается, что

угол v задает ориентацию медленной срединной оси) и $\Delta_r \approx GS$. Хорошо видно, что при $G < G_{\text{НОС}}$ χ и GS могут быть определены очень точно. Кроме этого видно, что вне диапазона пренебрежимой оптической хиральности оценка $v \approx \chi$ остается хорошей в большом диапазоне значений G . Точность оценки $\Delta_r \approx GS$ при $G > G_{\text{НОС}}$ в целом хуже, чем точность оценки $v \approx \chi$, но может считаться приемлемой до $G = 40^\circ$. Отметим, что для конфигураций с $\phi = 0$ $\Delta_r = GS$ при любых значениях G . Если ϕ мало, оценка $\Delta_r \approx GS$ может давать приемлемую точность и при больших значениях G . На рисунке Б.5 представлены оценки максимального отклонения $\max|\Delta_r - GS|$ при $|\phi| < 2^\circ$, $|\phi| < 5^\circ$ и $|\phi| < 10^\circ$. Эти оценки были получены на ансамбле из 50000 случайно генерированных четырехслойных систем.

Из значений Δ_r , показанных на рис.Б.3, видно, что условие пренебрежимой малости оптической хиральности в видимом диапазоне для рассматриваемых образцов склеры и дермы не удовлетворяется, и на всех картах можно увидеть некоторую вариацию ϕ . Для всех образцов среднее значение ϕ приблизительно равно нулю и ϕ варьируется в пределах относительно узкого интервала. Как можно видеть, с увеличением длины волны значения ϕ в областях, где ϕ заметно отличается от нуля, уменьшаются по величине, то есть дисперсия ϕ уменьшается с увеличением λ (это хорошо видно из графиков функции распределения ϕ на рис.Б.3). Это полностью согласуется с тем, что видно на рис.Б.4: увеличение λ приводит к уменьшению G и, следовательно, к уменьшению $|\phi|$.

Для любой из представленных карт максимальное значение $|\phi|$ не будет превышать значения, предсказываемое описанной моделью, если взять G равным максимальному Δ_r на этой карте или немного больше. Согласно приведенным оценкам при значениях Δ_r и ϕ для рассматриваемых образцов склеры и дермы точность соотношений $v \approx \chi$ и $\Delta_r \approx GS$ является хорошей по всему видимому диапазону или, по меньшей мере, в красной области спектра. Это дает основание считать, что медленная срединная ось ориентирована в направлении преимущественной ориентации коллагеновых волокон, среднем по толще образца, не только в областях с $\phi \approx 0$, а по всей площади картографирования, и принять эффективный показатель двулучепреломления, рассчитываемый по формуле (Б.13), в качестве величины, характеризующей степень ориентационного порядка и плотность упаковки коллагеновых волокон с усреднением по толще образца.

На основании проделанного анализа можно заключить, что наиболее полная характеристика макроструктуры исследуемой ткани при поляризационном картографировании может быть достигнута при выполнении следующих критериев:

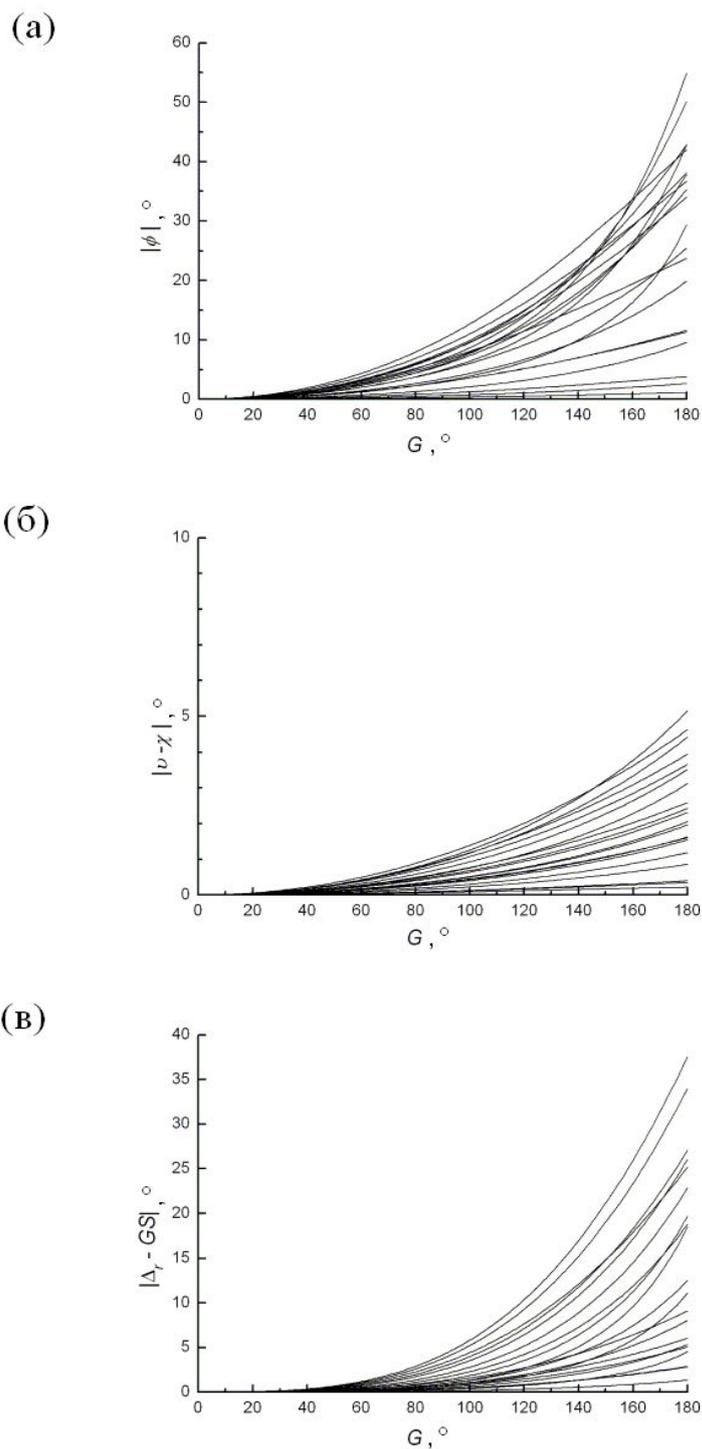


Рисунок Б.4. Результаты компьютерного моделирования для 20 случайно генерированных четырехслойных структур, состоящих из фазовых пластин. Зависимость характеристического угла ϕ (а), точности оценки направления преимущественной ориентации фазовых пластин (б) и эффективной фазовой задержки GS (в) от величины суммарной фазовой задержки G .

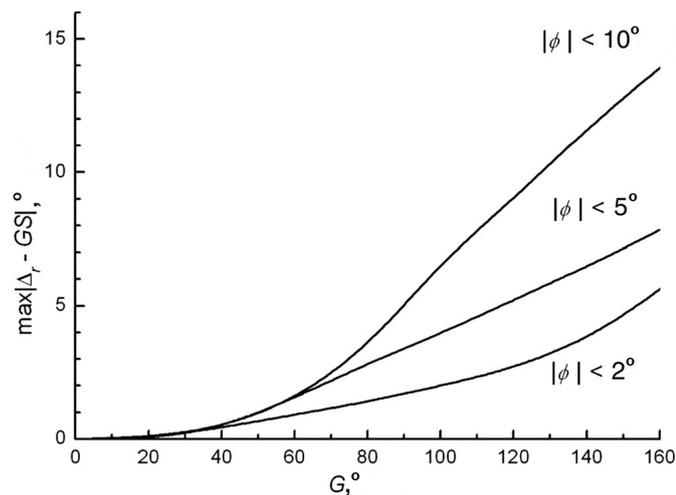


Рисунок Б.5. Зависимость максимального значения $\max|\Delta_r - GS|$ величины суммарной фазовой задержки G для ансамбля из 50000 случайно генерированных четырехслойных систем при различных ограничениях на ϕ .

1. исследуемый образец должен быть достаточно прозрачным – прозрачность (коэффициент пропускания для недеполяризованной части регистрируемой компоненты прошедшего света) должна быть больше 5%;
2. значения угла фазовой задержки δ должно изменяться в пределах от 10° до 90° ;
3. значение угла оптической хиральности ϕ по модулю должно быть меньше 15° .

Таким образом, проведенные оценки позволяют сделать вывод, что во многих случаях низкоапертурное поляризационное картографирование позволяет точно количественно охарактеризовать ориентацию коллагеновых волокон в толстых образцах склеры и дермы. Выявлены критерии, при выполнении которых картографирование может дать точные оценки параметров ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах.

Б.5 Картографирование образцов склеры

В настоящем разделе представлены результаты исследования образцов склеры, взятых у крысы, кролика, свиньи и человека, нацеленного на оценку возможностей и ограничений применения метода трансмиссионного поляризационного картографирования для характеристики коллагенового матрикса склеры.

В нативном состоянии склера сильно рассеивает свет и при толщине больше 300 мкм является практически непрозрачной. Достаточный для картографирования уровень прозрачности толстых образцов склеры может быть достигнут посредством оптического иммерсионного просветления. Иммерсионное просветление существенно увеличивает прозрачность

ткани и, в то же время, значительно понижает эффективный коэффициент двулучепреломления ткани и, как следствие, фазовую задержку. Поэтому актуальной задачей является поиск условий иммерсионного просветления, при которых образцы обладали бы достаточно высокой прозрачностью, и, в то же время, удовлетворяли условию 2 (раздел Б.4). Еще один фактор, подлежащий учету при оценке возможностей поляризационного картографирования, состоит в следующем. Картографирование на одной длине волны занимает около 5 минут, и важно, чтобы за время измерений оптические свойства образца не менялись. Стационарность (неизменность) свойств образца особенно важна при измерениях спектральных зависимостей, занимающих обычно около 30 минут. Особый интерес представляла возможность фронтального картографирования образцов склеры, когда образец освещается перпендикулярно естественной поверхности склеры.

Материалы и методы

В работе изучались образцы склеры крысы, кролика, свиньи и человека. Образцы склеры человека были взяты у пациентов с диагнозами: терминальная болящая глаукома, субатрофия глазного яблока. У всех пациентов на протяжении длительного времени острота зрения исследуемых глаз равнялась нулю. От энуклеированных глаз были взяты образцы склеры с заднего полюса глаза и с экватора. Необходимая прозрачность образцов достигалась с помощью метода иммерсионного оптического просветления. В качестве иммерсионных агентов использовались 82,3% и 41,2% водные растворы глицерина и 40% водный раствор глюкозы. Прозрачность образцов определялась на основе анализа изображений с учетом флуктуаций источника освещения. Толщина образцов измерялась с помощью микрометра.

Результаты

Как показали исследования, поляризационное картографирование склеры крысы, благодаря малой толщине ткани, в принципе, может осуществляться без применения иммерсионного просветления. На рисунке Б.6 представлены карты характеристических углов для образца склеры крысы в физиологическом растворе. Толщина образца составила 175 мкм. Средняя прозрачность образца составила 2,1%. Иммерсионное просветление этого образца в глицерине в течение суток привело к увеличению прозрачности до 76%. Однако при этом существенно уменьшилось двулучепреломление образца. Средняя фазовая задержка стала меньше 10° и образец перестал удовлетворять критерию 2, вследствие чего стала невозможной количественная оценка параметров ориентации коллагеновой структуры. Возможно, кар-

тографирование образцов склеры крысы без иммерсионного просветления является близким к оптимальному.

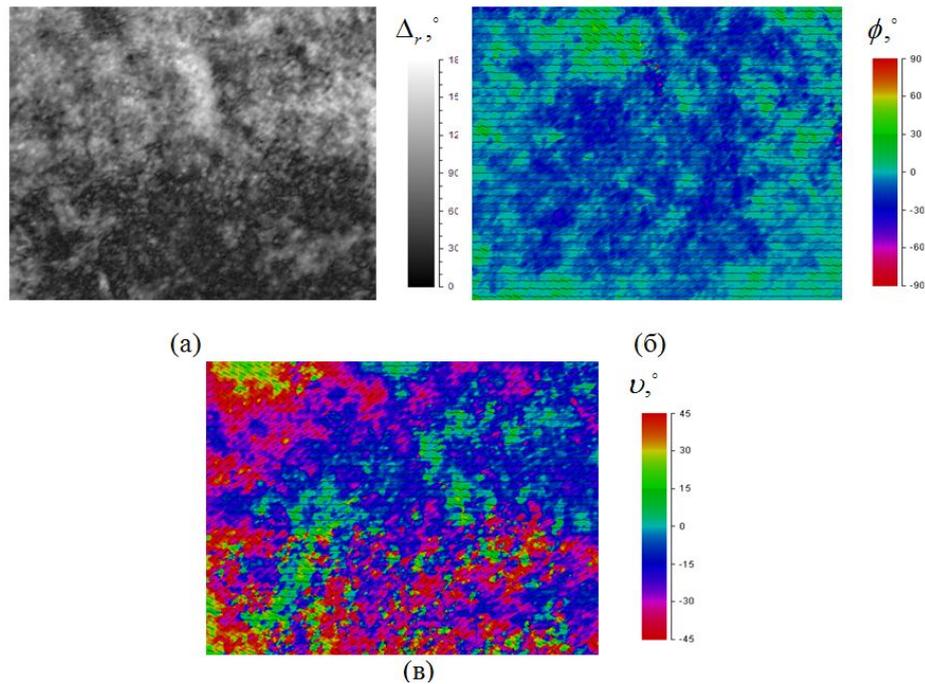


Рисунок Б.6. Результаты картографирования для образца склеры крысы в физиологическом растворе: (а) – карта Δ_r , (б) – карта ϕ , (в) – карта ν . Размер картографируемой области 1,54 мм \times 1,2 мм.

Во всех остальных случаях для проведения поляризационного картографирования было необходимо иммерсионное просветление образцов. Эксперименты показали, что при использовании любого из указанных просветляющих агентов скорость изменения свойств образцов становилась достаточно малой для картографирования только приблизительно через сутки после применения просветляющего агента. В это время ткань находится в стадии набухания, а это относительно медленный процесс.

Как показали эксперименты, поляризационное картографирование склеры кролика может быть проведено при использовании любого из трех иммерсионных агентов. На рисунках Б.7 и Б.8 в качестве примера показаны карты характеристических углов для образцов склеры кролика, просветленных в 40% растворе глюкозы и в 82,3% растворе глицерина в течение суток. За время выдерживания образца в растворе глюкозы его толщина увеличилась в 2,2 раза и составила 885 мкм. Средняя прозрачность образца в результате просветления составила 13%. При просветлении в 82,3% растворе глицерина толщина образца через сутки увеличилась в 1,8 раз и составила 708 мкм. Средняя прозрачность составила 51%.

При просветлении образца склеры кролика в 41,2% растворе глицерина толщина образца в течение суток увеличилась в 2,1 раза. Прозрачность после просветления в этом иммерсион-

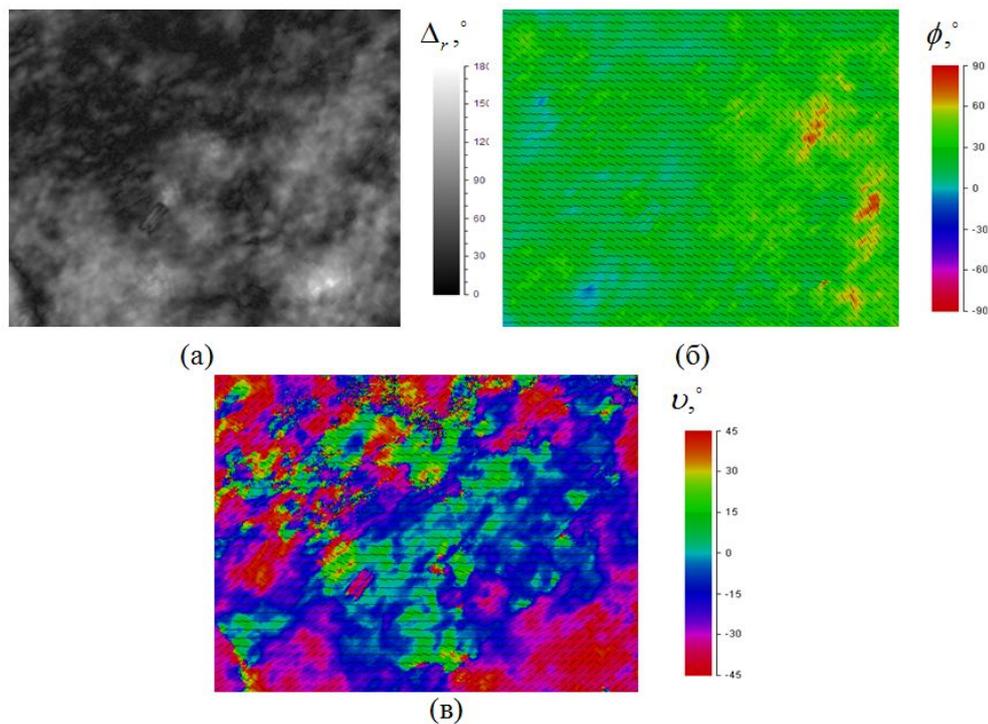


Рисунок Б.7. Результаты картографирования для образца склеры кролика, просветленного в 40% растворе глюкозы в течение 1 суток: (а) – карта Δ_r , (б) – карта ϕ , (в) – карта ν .
Размер картографируемой области 1,54 мм × 1,2 мм.

ном агенте составила 9,8% при толщине 683 мкм. Условия, наиболее близкие к оптимальным, реализовались при использовании 82,3% раствора глицерина.

Рисунок Б.9 иллюстрирует возможность картографирования большой площади ткани. Показаны карты протяженного участка образца склеры кролика, покрывающего почти все расстояние от роговицы до зрительного нерва. Длина области картографирования – 7,3 мм, ширина – 1,3 мм. Образец был просветлен в 82,3% растворе глицерина.

Было выяснено, что для образцов склеры человека поляризационное картографирование при оптическом просветлении образцов также применимо, но с определенными ограничениями. Было установлено, что для образцов с задней области глазного яблока в рассматриваемых условиях невозможно осуществить фронтальное картографирование. В этой области, склера является очень толстой (>2 мм), и используемые средства оптического просветления не обеспечивают достаточной прозрачности образца. Но для этих областей возможно картографирование поперечных срезов толщиной до 1 мм. Для образцов склеры из экваториальной области возможно и фронтальное зондирование. То же самое можно сказать и о склере свиньи.

На рисунке Б.10 в качестве примера показаны карты характеристических углов для поперечных срезов образцов склеры человека с задней области глаз, просветленных в 82,3%

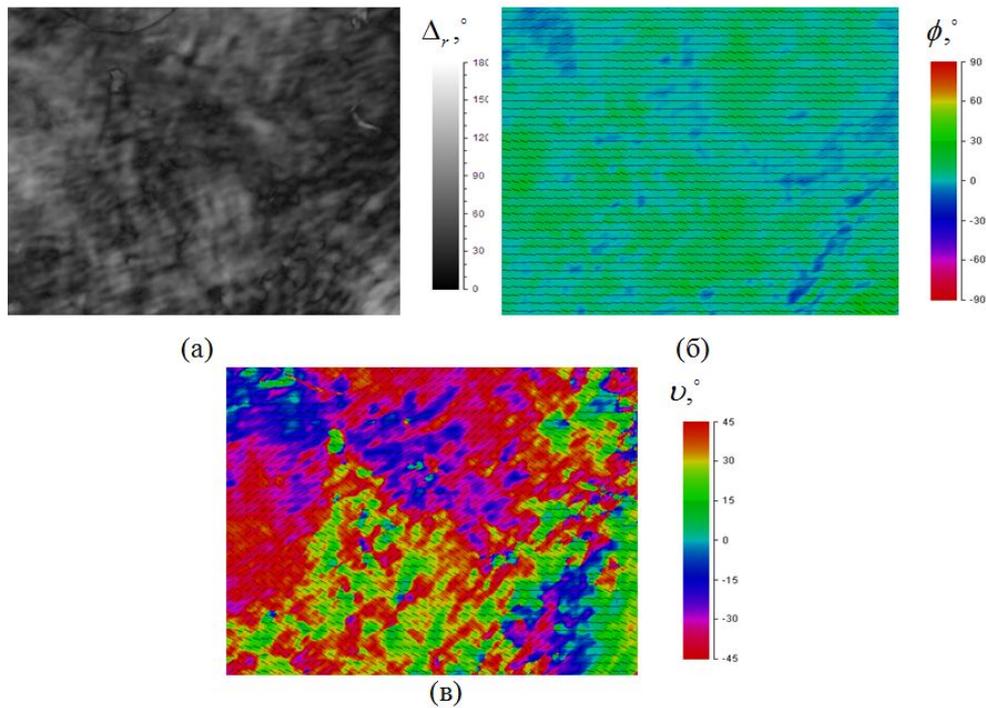


Рисунок Б.8. Результаты картографирования для образца склеры кролика, просветленного в 82,3% растворе глицерина в течение 1 суток: (а) – карта Δ_r , (б) – карта ϕ , (в) – карта ν . Размер картографируемой области 1,54 мм \times 1,2 мм.

растворе глицерина. Результаты картографирования для поперечного среза образца склеры человека с экваториальной области глаза показаны на рисунке Б.11. Рисунок Б.12 представляет результаты фронтального картографирования образца склеры с экваториальной области глаза, также просветленного в 82,3% растворе глицерина.

По картам характеристических углов ϕ и ν для экваториальной области склеры, показанным на рисунках Б.11 и Б.12, можно заключить, что коллагеновые пучки по всей толщине образца идут практически параллельно естественной поверхности склеры, то есть структура склеры является квазипланарной. В то же время имеется некоторое преимущественное направление ориентации волокон, параллельное поверхности склеры (рисунок Б.12 (в)). Все это соответствует общепринятым представлениям о структуре склеры. Для образцов склеры с задней области глазного яблока, судя по картам, показанным на рисунке Б.10, выраженная квазипланарная ориентация (такая, как в экваториальной области) имеет место только у внутренней поверхности склеры, в слое толщиной около миллиметра (рисунок Б.10 (в) и (е)). В остальных областях (ближе к внешней поверхности склеры) ориентационный порядок коллагеновых волокон является, судя по картам на рисунках Б.10 (а) и (г), значительно меньшим, чем у внутренней поверхности, и также существуют зоны, направление преимущественной ориентации коллагеновых волокон в которых сильно наклонено относительно

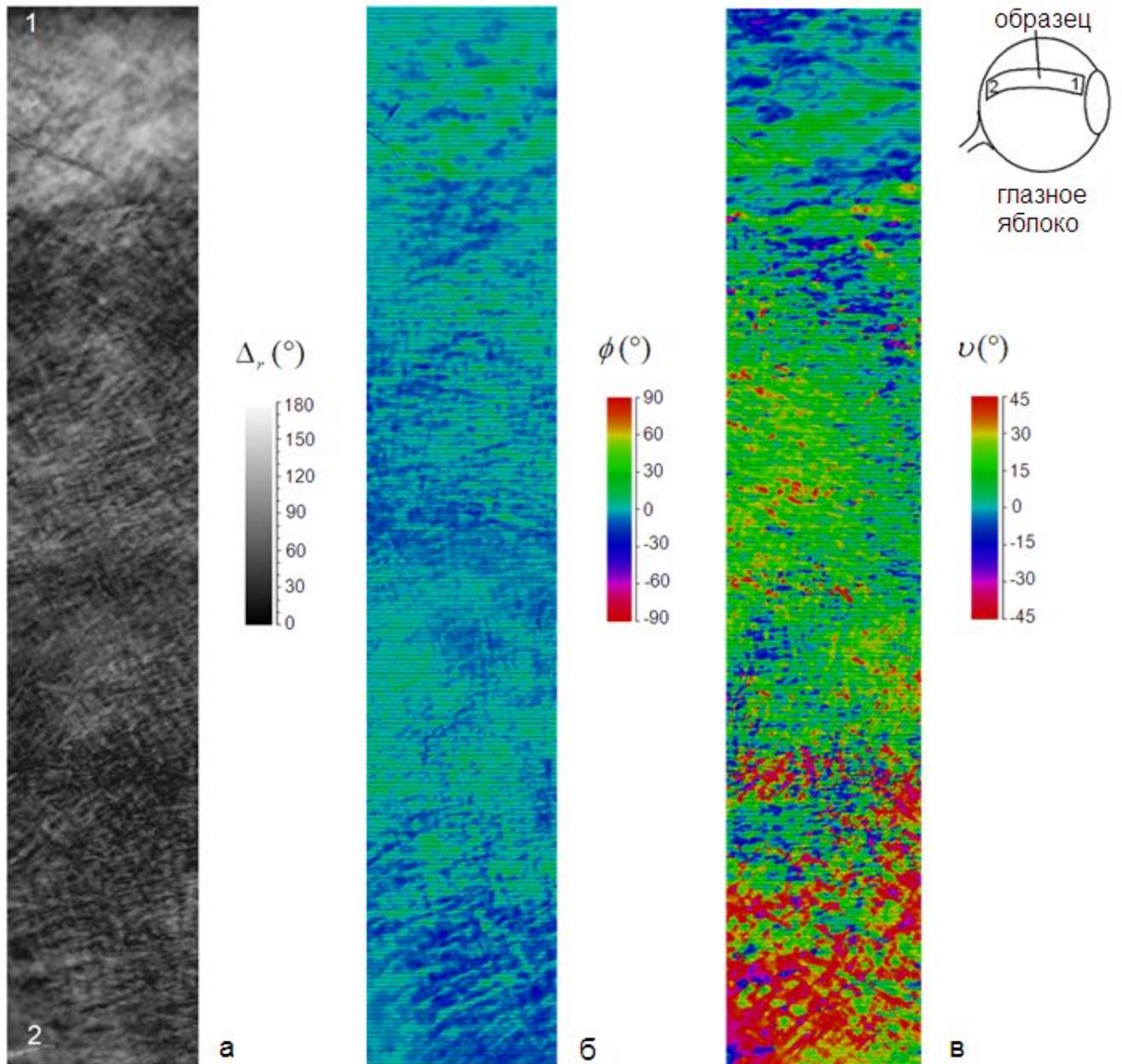


Рисунок Б.9. Результаты картографирования для образца склеры кролика, просветленного в 82,3% растворе глицерина в течение 3 суток: (а) – карта Δ_r , (б) – карта ϕ , (в) – карта ν ; 1 – область ближе к роговице, 2 – область ближе к зрительному нерву. Размер картографируемой области 1,3 мм \times 7,3 мм.

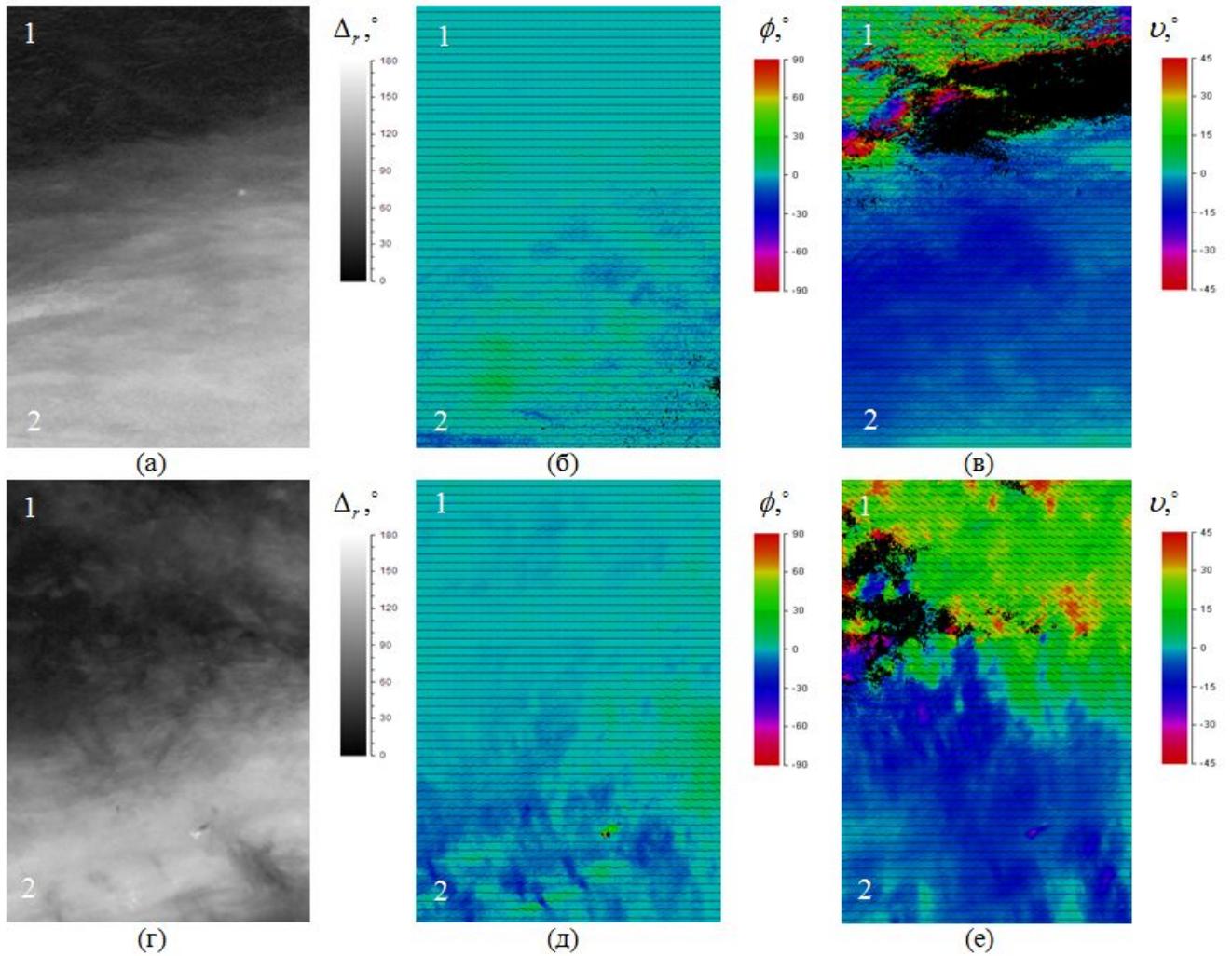


Рисунок Б.10. Результаты картографирования для поперечных срезов образцов склеры человека с задней области, просветленных в 82,3% растворе глицерина. (а)-(в) D.S. терминальная глаукома, (г)-(е) D.S. субатрофия. (а), (г) – карта Δ_r , (б), (д) – карта ϕ , (в), (е) – карта ν ; 1 – область ближе к внешней поверхности склеры, 2 – область ближе к внутренней поверхности. Размер картографируемой области 1,12 мм \times 1,64 мм.

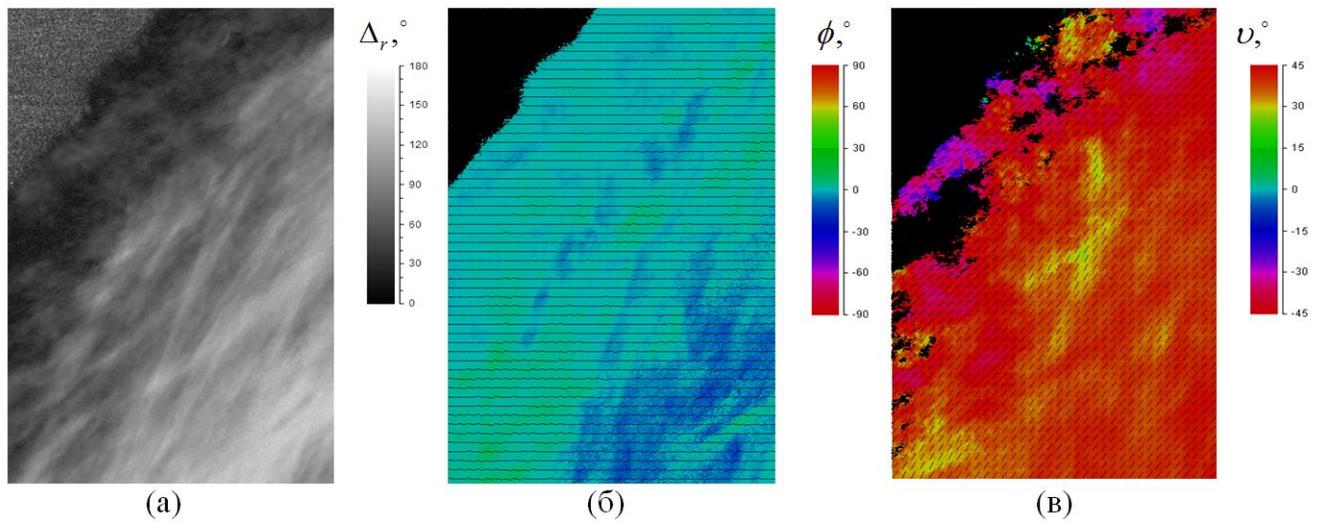


Рисунок Б.11. Результаты картографирования для поперечного среза образца склеры человека с экваториальной области, просветленного в 82,3% растворе глицерина. D.S. терминальная глаукома: (а) – карта Δ_r , (б) – карта ϕ , (в) – карта ν . Размер картографируемой области 1,12 мм \times 1,64 мм.

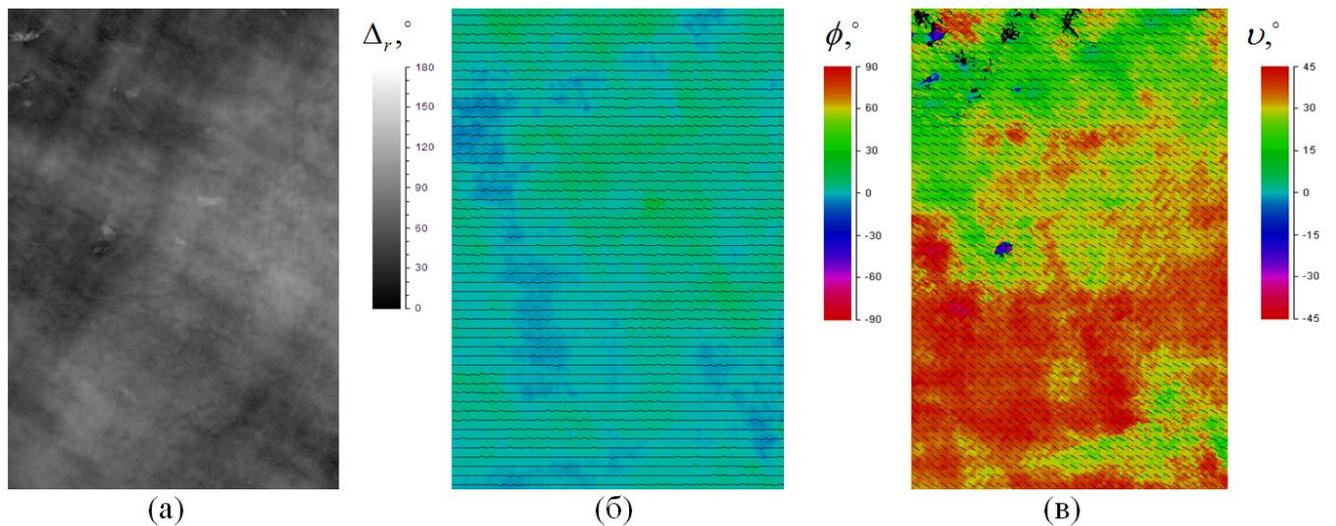


Рисунок Б.12. Результаты фронтального картографирования для образца склеры человека с экваториальной области, просветленного в 82,3% растворе глицерина. D.S. терминальная глаукома. Толщина образца в картографируемой области – 723 мкм: (а) – карта Δ_r , (б) – карта ϕ , (в) – карта ν . Размер картографируемой области 1,12 мм \times 1,64 мм.

внутренней поверхности склеры (рисунок Б.10 (в) и (е)), то есть наблюдаются сильные отклонения от квазипланарности.

Б.6 Картографирование образцов вторичных сухожильных пучков

Основные экспериментальные результаты, представленные в главах 4 и 5, были получены на образцах вторичных сухожильных пучков хвоста крысы. Наряду с другими методами для характеристики этих образцов использовалось поляризационное картографирование. В настоящем разделе представляется типичный экспериментальный пример оценки структуры и оптических параметров сухожильных пучков с помощью поляризационного картографирования. Наряду с поляризационным картографированием в данном примере также используется оптическая когерентная томография (ОКТ), для определения размеров и геометрических профилей образца в рассматриваемой области.

На рисунке Б.13 представлены результаты картирования для образца нагруженного (натянутого) вторичного сухожильного пучка из хвоста крысы. Пучок был натянут и закреплен (концы пучка были зафиксированы в держателе) в нативном состоянии, будучи погруженным в физраствор, что практически устранило волнистость коллагеновой структуры, характерную сухожильным пучкам в свободном состоянии [248, 249], и задавало почти однородную ориентацию коллагеновых волокон в пучке [248–250].

Поляризационное картирование образца проводилось через двое суток после его погружения в 82,3% водный раствор глицерина. С момента погружения в глицерин образец находился между предметным и покровным стеклом. Форма и размеры пучка контролировались с помощью оптического когерентного томографа ThorLabs-ОСР930SR.

Картирование осуществлялись при квазимонохроматическом освещении образца с пятью интерференционными фильтрами с длиной волны в максимуме пропускания 466, 538, 544, 571 и 667 нм и шириной полосы пропускания 8–12 нм. Полученные карты характеристических углов Δ_r , ϕ и ν при $\lambda_c = 466, 544$ и 667 нм показаны на рисунке Б.13. Эти карты свидетельствуют о том, что ориентация коллагеновых волокон в образце близка к однородной, что особенно хорошо видно из карт характеристического угла ν – пространственная вариация этого угла является очень медленной.

Для сравнения на рисунке Б.14 представлены карты ϕ и ν для просветленного в глицерине ненагруженного сухожильного пучка из хвоста крысы, свидетельствующие о сильной квазипериодической азимутальной вариации локального направления преимущественной ориентации коллагеновых волокон в образце.

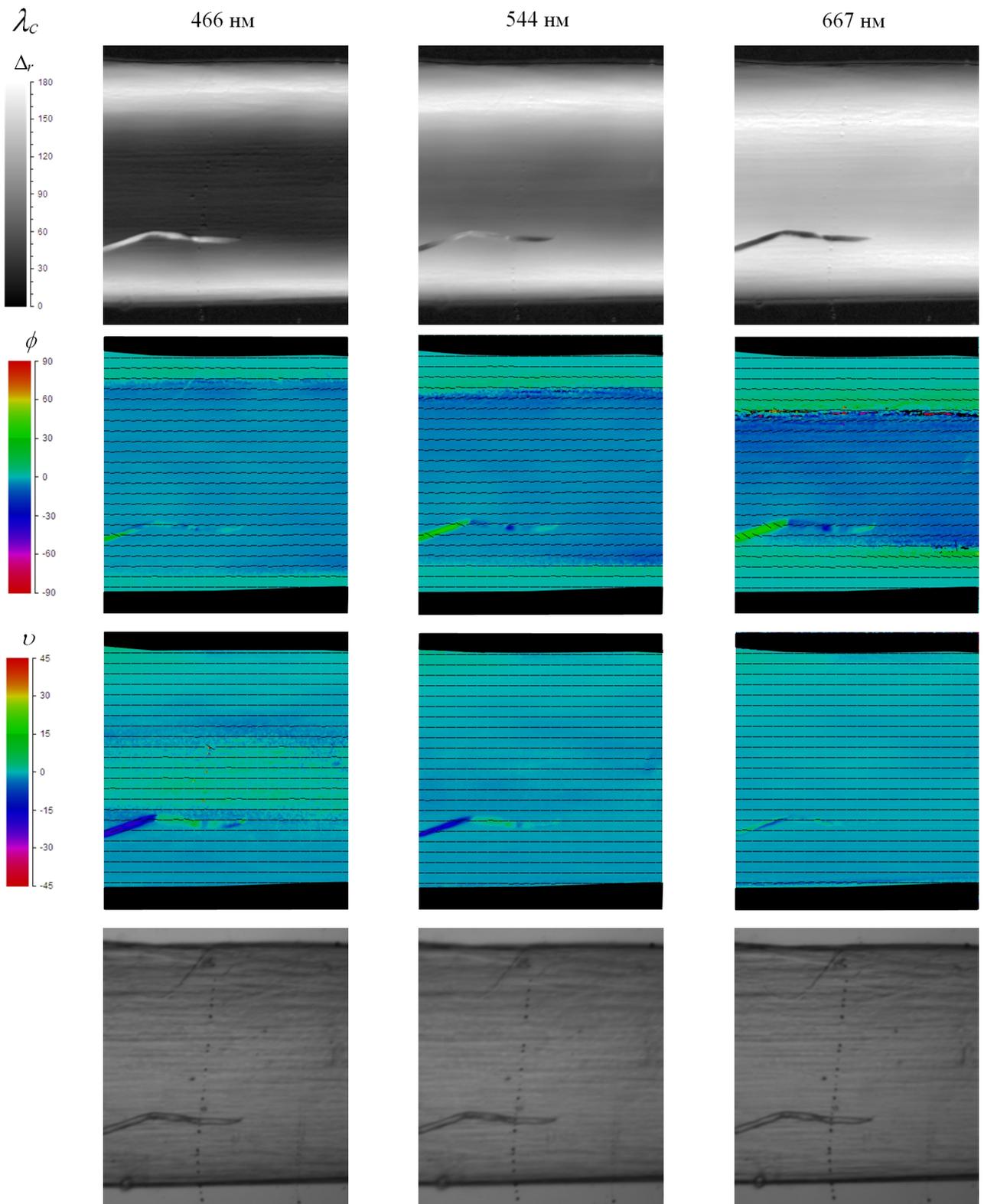


Рисунок Б.13. Карты характеристических углов Δ_r , ϕ и ν и изображения образца в неполяризованном свете (нижний ряд) для нагруженного пучка сухожилия хвоста крысы. Ширина области картографирования 1,12 мм.

В то же время карты ϕ , представленные на рисунке Б.13, показывают малую, но регулярную вариацию ориентации коллагеновых волокон по толще пучка. Проведенный анализ и численное моделирование показали, что наблюдаемая пространственная вариация ϕ может

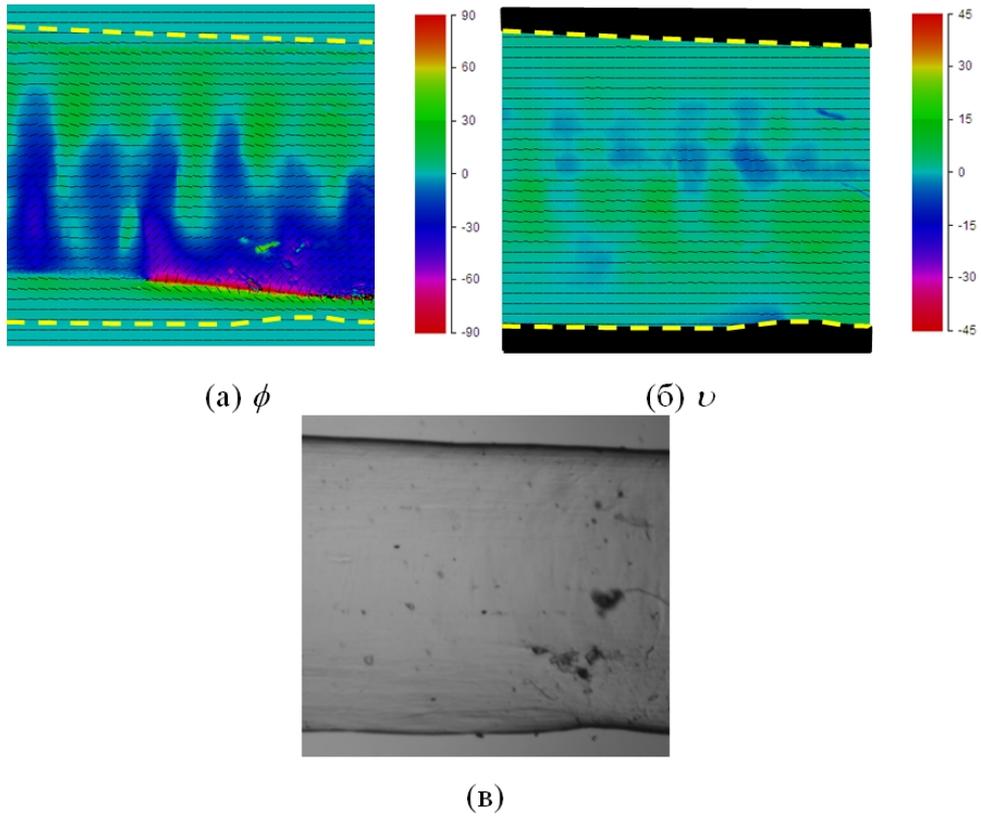


Рисунок Б.14. Карты характеристических углов ϕ (а) и ν (б) и изображение образца в неполяризованном свете (в) для ненагруженного коллагенового пучка сухожилия хвоста крысы, просветленного в глицерине. $\lambda_c = 544$ нм. Ширина области картографирования 1,12 мм. Края пучка на картах ϕ и ν показаны желтыми пунктирными линиями.

быть полностью объяснена, исходя из модели ориентации коллагеновых волокон в нагруженном сухожильном пучке, показанной на рисунке Б.15 (спиральная структура с осью спирали, направленной вдоль оси пучка [249]). Приняв эту модель, мы нашли, что шаг спиральной структуры для данного пучка составлял около 55 мкм.

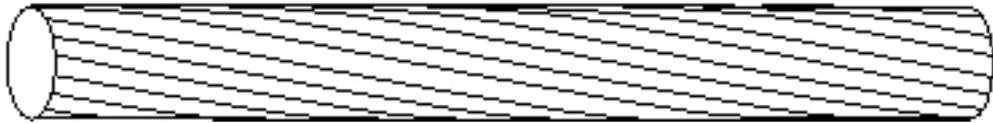


Рисунок Б.15. Линии ориентации коллагеновых волокон в скрученном нагруженном сухожильном пучке.

Численные оценки показали, что при таком большом шаге, несмотря на неоднородность структуры, с высокой точностью выполняется соотношение

$$\Delta_r = 2 \arccos (|\cos (\delta/2)|) = 2 \arccos \left(\left| \cos \left(\frac{\pi \langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle d}{\lambda} \right) \right| \right), \quad (\text{Б.23})$$

где δ , $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$ и d – соответственно фазовая задержка, средний эффективный показатель двулучепреломления и толщина образца в рассматриваемой области, пользуясь которым мы определяли $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$; в данном случае угловые скобки обозначают усреднение по толщине образца. Локальные значения d были определены по ОКТ-профилю пучка. Геометрия пучка и используемая система координат показаны на рисунке Б.16.

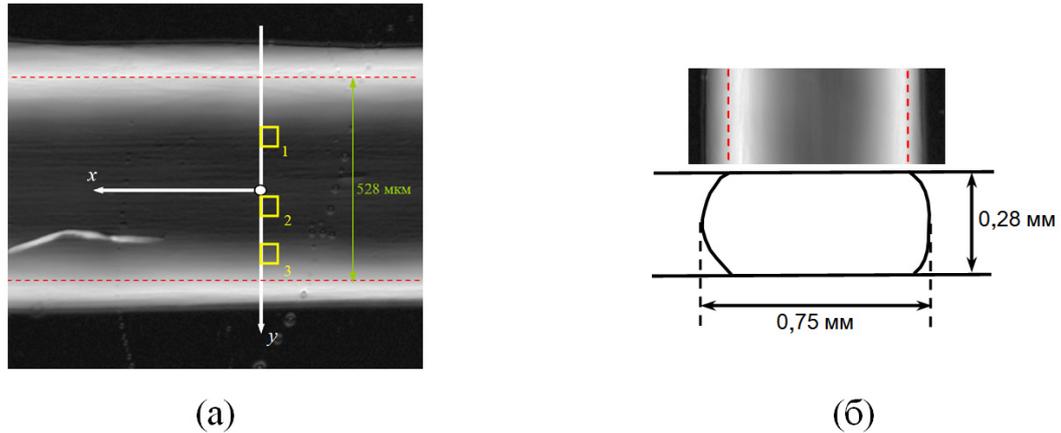


Рисунок Б.16. (а) Карта Δ_r образца нагруженного сухожильного пучка для длины волны 466 нм и используемая система координат $\{x, y, z\}$ (ось z направлена на наблюдателя). (б) Сечение пучка, восстановленное по ОКТ-скану, и участок карты Δ_r для длины волны 544 нм. Красные пунктирные линии показывают границы области, в пределах которой ткань соприкасается с предметным и покровным стеклами (в пределах этой области толщина ткани варьируется в пределах от 270 до 280 мкм из-за наклона покровного стекла). Показанное сечение пучка приблизительно соответствует плоскости y - z на рисунке.

Как следует из карт Δ_r , представленных на рисунке Б.13, значение ϕ по сечению пучка для разных длин волн изменялось в пределах от 0 до 360°. Области, в которых ϕ близко к 180°, выглядят на картах Δ_r белыми. Величина ϕ увеличивается к центру пучка и спадает до нуля у краев. В пределах большой области, очерченной на рисунке Б.16 красными пунктирными линиями, толщина пучка варьировалась не сильно – в этой области пучок плотно соприкасался с предметным и покровным стеклами. Из показанных на этом же рисунке карт Δ_r видно, что в этой области Δ_r варьируется сильно, значительно сильнее, чем можно было бы ожидать, учитывая только вариацию d , что, по всей видимости, обусловлено неоднородностью концентрации глицерина в ткани.

На рисунке Б.17 представлена найденная зависимость среднего эффективного показателя двулучепреломления $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$ для $\lambda = 544$ нм от координаты y . В данном случае угловые скобки обозначают усреднение не только по толщине образца, но и по координате x в интервале значений x $[-100 \text{ мкм}, 0]$. Планки на рис. Б.17 показывают погрешность измеренных значений $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$, рассчитанную, исходя из оценки погрешности определения фазовой задержки $\delta =$

$2\pi \langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle d/\lambda$ в соответствии с формулой

$$\varepsilon_\delta = \frac{2}{|\sin \delta_e|} \varepsilon_t \quad (\text{Б.24})$$

где δ_e – измеренное значение δ , ε_t – абсолютная погрешность определения приведенного пропускания, при $\varepsilon_t=0,019$ [эта оценка получена по отклонениям Δ_r от 0 и 180° в области экстремумов функции $\Delta_r(y)$].

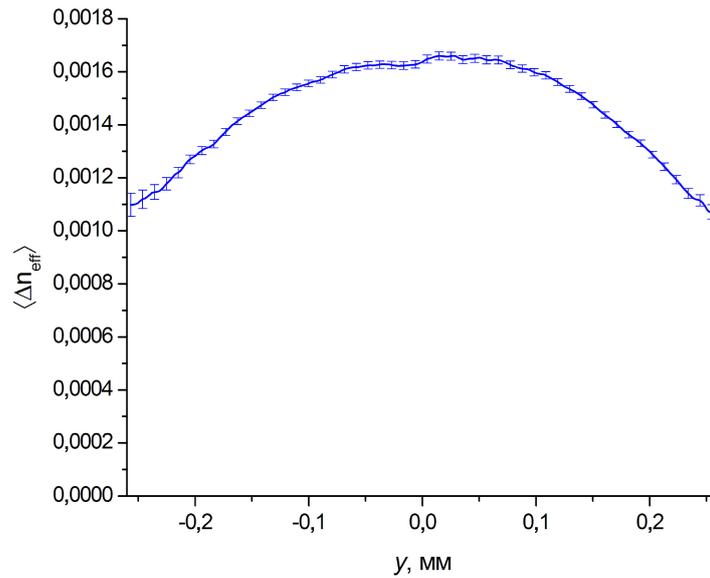


Рисунок Б.17. Зависимость среднего эффективного показателя двулучепреломления для $\lambda = 544$ нм от координаты по оси, перпендикулярной направлению сухожильного пучка. Используемая система координат показана на рис. Б.16. Средние значения для каждого значения y получались усреднением по интервалу значений x $[-100$ мкм, $0]$.

Экспериментальные спектральные зависимости $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$ для разных областей пучка хорошо аппроксимируются функциями вида

$$f_{\Delta_{\text{nc}}}(\lambda) = a_{\Delta_{\text{nc}}} \cdot h_{\Delta_{\text{nc}}}(\lambda), \quad (\text{Б.25})$$

где

$$h_{\Delta_{\text{nc}}}(\lambda) = 0,90024 + \frac{29522,6}{\lambda_{\text{nm}}^2}$$

λ_{nm} – числовое значение длины волны при ее измерении в нанометрах; $h_{\Delta_{\text{nc}}}(\lambda = 544 \text{ нм}) = 1$. Для иллюстрации на рисунке Б.18 представлены найденные спектральные зависимости $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$ для трех областей пучка, показанных квадратиками на рисунке Б.16 (области 1, 2 и

3), аппроксимированные кривыми вида (Б.25) с $a_{\Delta n_{\text{nc}}}$ равным 0,00148 для области 1, 0,00166 для области 2 и 0,00141 для области 3. Как видно из этого рисунка, для всех трех областей отклонение экспериментальных точек от аппроксимирующих кривых не превышает погрешности измерений.

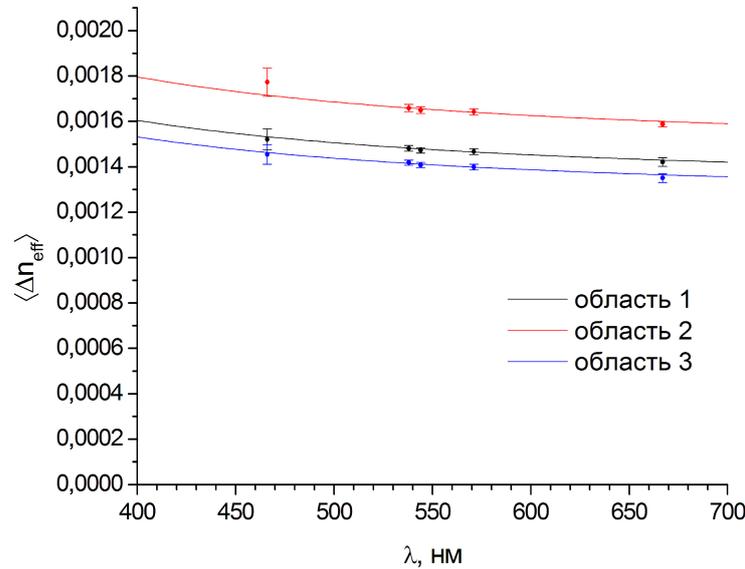


Рисунок Б.18. Спектральные зависимости среднего эффективного показателя двулучепреломления для трех областей сухожильного пучка, показанных на рис. Б.16.

Аналогичным образом проведенные измерения $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$ на просветленных в глицерине образцах склеры кролика, склеры свиньи и кожи крысы в стадии набухания (время нахождения образцов в глицерине к моменту измерений составляло сутки или более) показали, что спектральные зависимости $\langle \Delta n_{\text{eff}} \rangle$ для различных участков таких образцов тоже хорошо аппроксимируются кривыми вида (Б.25), но с различными значениями $a_{\Delta n_{\text{nc}}}$. Ни для одного из исследованных образцов расхождение между экспериментальными данными и аппроксимирующими кривыми вида (Б.25) не превысило погрешности измерений.

Таким образом, в ходе выполнения данной диссертационной работы была показана принципиальная возможность достаточно точного поляризационно-микроскопического картографирования ориентации коллагена в толстых (до 2 мм толщиной) образцах тканей, таких как склера, без секционирования, при применении техники иммерсионного просветления ткани. Также были выявлены условия, при которых поляризационное картографирование способно обеспечить достаточно точные оценки параметров ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах.

Список литературы

1. Wollensak G., Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2004. — Vol. 30, no. 3. — Pp. 689–695.
2. Wollensak G., Iomdina E. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA) // *Acta ophthalmologica*. — 2009. — Vol. 87, no. 2. — Pp. 193–198.
3. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA / G. Wollensak, E. Iomdina, D. D. Dittert et al. // *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. — 2005. — Vol. 83, no. 4. — Pp. 477–482.
4. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera / Y. Zhang, Z. Li, L. Liu et al. // *BioMed research international*. — 2014. — Vol. 2014. — Pp. 1–5.
5. Оптическое просветление склеры глаза *in vivo* под действием глюкозы / Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, Ю. П. Синичкин, В. В. Тучин // *Квантовая электроника*. — 2006. — Т. 36, № 12. — С. 1119–1124.
6. Tuchin V. V. Optical clearing of tissues and blood. — Spie Bellingham, Washington, 2006. — P. 256.
7. Recent progress in tissue optical clearing / D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, V. V. Tuchin // *Laser & photonics reviews*. — 2013. — Vol. 7, no. 5. — Pp. 732–757.
8. Оптическое просветление тканей кожи *ex vivo* под действием полиэтиленгликоля / Д. К. Тучина, В. Д. Генин, А. Н. Башкатов и др. // *Оптика и спектроскопия*. — 2016. — Т. 120, № 1. — С. 36–45.

9. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*. — 2015. — Т. 15, № 4. — С. 37–41.
10. Irreversible optical clearing of rabbit dermis for autogenic corneal stroma transplantation / Y. Tanaka, D. Shi, A. Kubota et al. // *Biomaterials*. — 2011. — Vol. 32, no. 28. — Pp. 6764–6772.
11. *Hatami-Marbini H., Rahimi A.* Interrelation of hydration, collagen cross-linking treatment, and biomechanical properties of the cornea // *Current eye research*. — 2016. — Vol. 41, no. 5. — Pp. 616–622.
12. Quantitative mapping of scleral fiber orientation in normal rat eyes / M. J. A. Girard, A. Dahlmann-Noor, S. Rayapureddi et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2011. — Vol. 52, no. 13. — Pp. 9684–9693.
13. Microstructural differences in the human posterior sclera as a function of age and race / D. Yan, S. McPheeters, G. Johnson et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2011. — Vol. 52, no. 2. — Pp. 821–829.
14. Changes in scleral collagen organization in murine chronic experimental glaucoma / J. K. Pijanka, E. C. Kimball, M. E. Pease et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2014. — Vol. 55, no. 10. — Pp. 6554–6564.
15. Quantitative mapping of collagen fiber orientation in non-glaucoma and glaucoma posterior human sclerae / J. K. Pijanka, B. Coudrillier, K. Ziegler et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2012. — Vol. 53, no. 9. — Pp. 5258–5270.
16. Glaucoma-related changes in the mechanical properties and collagen micro-architecture of the human sclera / B. Coudrillier, J. K. Pijanka, J. L. Jefferys et al. // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10, no. 7. — P. e0131396.
17. Application of second harmonic imaging microscopy to assess structural changes in optic nerve head structure *ex vivo* / D. J. Brown, N. Morishige, A. Neekhra et al. // *Journal of biomedical optics*. — 2007. — Vol. 12, no. 2. — P. 024029.
18. Polarization microscopy for characterizing fiber orientation of ocular tissues / N. J. Jan, J. L. Grimm, H. Tran et al. // *Biomedical optics express*. — 2015. — Vol. 6, no. 12. — Pp. 4705–4718.

19. Jan N. J., Lathrop K. L., Sigal I. A. Collagen architecture of the posterior pole: high-resolution wide field of view visualization and analysis using polarized light microscopy // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2017. — Vol. 58, no. 2. — Pp. 735–744.
20. Rada J. A. S., Shelton S., Norton T. T. The sclera and myopia // *Experimental eye research*. — 2006. — Vol. 82, no. 2. — Pp. 185–200.
21. Вум В. В. Строение зрительной системы человека. — Одесса: Астропринт, 2003. — С. 65.
22. Adler's Physiology of the Eye / L. A. Levin, S. F. E. Nilsson, J. Ver Hoeve et al. — Elsevier Health Sciences, 2011. — P. 808.
23. Фадеев А. С., Левачев С. М., Измайлова В. Н. Мономолекулярные слои коллагена // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. — 1999. — Т. 40, № 4.
24. Fratzl P. Collagen: structure and mechanics. — Springer Science+Business Media, 2008. — P. 516.
25. Watson P. G., Young R. D. Scleral structure, organisation and disease. A review // *Experimental eye research*. — 2004. — Vol. 78, no. 3. — Pp. 609–623.
26. Bhattacharjee A., Bansal M. Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario // *IUBMB life*. — 2005. — Vol. 57, no. 3. — Pp. 161–172.
27. Atomic force microscopy of the cornea and sclera / N. J. Fullwood, A. Hammiche, H. M. Pollock et al. // *Current eye research*. — 1995. — Vol. 14, no. 7. — Pp. 529–535.
28. Birk D. E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly // *Micron*. — 2001. — Vol. 32, no. 3. — Pp. 223–237.
29. Maurice D. M. The cornea and sclera // *Vegetative Physiology and Biochemistry*. — Elsevier, 1962. — Pp. 289–368.
30. Komai Y., Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 1991. — Vol. 32, no. 8. — Pp. 2244–2258.
31. Иомдина Е. Н., Бауэр С. М., Котляр К. Е. Биомеханика глаза: теоретические аспекты и клинические приложения. — М.: Реал Тайм, 2015. — С. 208.

32. *McBrien N. A., Jobling A. I., Gentle A.* Biomechanics of the sclera in myopia: extracellular and cellular factors // *Optometry and Vision Science*. — 2009. — Vol. 86, no. 1. — Pp. E23–E30.
33. *Иомдина Е. Н.* Механические свойства тканей глаза человека // *Современные проблемы биомеханики*. — 2006. — Т. 11. — С. 183–200.
34. *Friberg T. R., Lase J. W.* A comparison of the elastic properties of human choroid and sclera // *Experimental eye research*. — 1988. — Vol. 47, no. 3. — Pp. 429–436.
35. *Arciniegas A., Amaya L. E.* Mechanical behavior of the sclera // *Ophthalmologica*. — 1986. — Vol. 193, no. 1-2. — Pp. 45–55.
36. Особенности внеклеточного матрикса теноновой капсулы при прогрессирующей миопии / Е. Н. Иомдина, Н. Ю. Игнатьева, Н. А. Данилов и др. // Сборник трудов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 110-летию юбилею МНИИ ГБ им. Гельмгольца под ред. В.В. Нероева. — Т. 2. — 2010. — С. 309–315.
37. *McBrien N. A., Cornell L. M., Gentle A.* Structural and ultrastructural changes to the sclera in a mammalian model of high myopia // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2001. — Vol. 42, no. 10. — Pp. 2179–2187.
38. *Spaide R. F., Ohno-Matsui K., Yannuzzi L. A.* Pathologic myopia. — NY. : Springer New York, 2014. — P. 376.
39. *Sieglwart Jr J. T., Norton T. T.* Regulation of the mechanical properties of tree shrew sclera by the visual environment // *Vision research*. — 1999. — Vol. 39, no. 2. — Pp. 387–407.
40. *Norton T. T., Rada J. A.* Reduced extracellular matrix in mammalian sclera with induced myopia // *Vision research*. — 1995. — Vol. 35, no. 9. — Pp. 1271–1281.
41. *Rada J. A., Nickla D. L., Troilo D.* Decreased proteoglycan synthesis associated with form deprivation myopia in mature primate eyes // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2000. — Vol. 41, no. 8. — Pp. 2050–2058.
42. Altered collagen fibril formation in the sclera of lumican-deficient mice / B. A. Austin, C. Coulon, C. Y. Liu et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2002. — Vol. 43, no. 6. — Pp. 1695–1701.

43. *Kannus P.* Structure of the tendon connective tissue // *Scandinavian journal of medicine & science in sports.* — 2000. — Vol. 10, no. 6. — Pp. 312–320.
44. The influence of swelling and matrix degradation on the microstructural integrity of tendon / H. R. C. Screen, V. H. Chhaya, S. E. Greenwald et al. // *Acta biomaterialia.* — 2006. — Vol. 2, no. 5. — Pp. 505–513.
45. *de Aro A. A., de Campos Vidal B., Pimentel E. R.* Biochemical and anisotropic properties of tendons // *Micron.* — 2012. — Vol. 43, no. 2-3. — Pp. 205–214.
46. *Kastelic J., Galeski A., Baer E.* The multicomposite structure of tendon // *Connective tissue research.* — 1978. — Vol. 6, no. 1. — Pp. 11–23.
47. *Rowe R. W. D.* The structure of rat tail tendon // *Connective Tissue Research.* — 1985. — Vol. 14, no. 1. — Pp. 9–20.
48. *Rowe R. W. D.* The structure of rat tail tendon fascicles // *Connective Tissue Research.* — 1985. — Vol. 14, no. 1. — Pp. 21–30.
49. *Fessel G.* Mechanics of collagen cross-links in tendon aging, disease and as potential treatment for injuries: Ph.D. thesis / ETH Zurich. — 2014.
50. *Kjær M.* Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading // *Physiological reviews.* — 2004. — Vol. 84, no. 2. — Pp. 649–698.
51. *Provenzano P. P., Vanderby Jr R.* Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon // *Matrix Biology.* — 2006. — Vol. 25, no. 2. — Pp. 71–84.
52. Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing / J. Diamant, A. Keller, E. Baer et al. // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences.* — 1972. — Vol. 180, no. 1060. — Pp. 293–315.
53. *Scott J. E., Orford C. R., Hughes E. W.* Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation // *Biochemical Journal.* — 1981. — Vol. 195, no. 3. — Pp. 573–581.
54. The influence of noncollagenous matrix components on the micromechanical environment of tendon fascicles / H. R. C. Screen, J. C. Shelton, V. H. Chhaya et al. // *Annals of biomedical engineering.* — 2005. — Vol. 33, no. 8. — Pp. 1090–1099.

55. *Игнатъева Н.* Коллаген – основной белок соединительной ткани // *Эстетическая медицина*. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 246–256.
56. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes / N. S. Malik, S. J. Moss, N. Ahmed et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. — 1992. — Vol. 1138, no. 3. — Pp. 222–228.
57. *Yamauchi M., Woodley D. T., Mechanic G. L.* Aging and cross-linking of skin collagen // *Biochemical and biophysical research communications*. — 1988. — Vol. 152, no. 2. — Pp. 898–903.
58. Characterization of age-related variation in corneal biomechanical properties / A. Elsheikh, B. Geraghty, P. Rama et al. // *Journal of the Royal Society Interface*. — 2010. — Vol. 7, no. 51. — Pp. 1475–1485.
59. *Saito M., Marumo K.* Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus // *Osteoporosis international*. — 2010. — Vol. 21, no. 2. — Pp. 195–214.
60. *Mattson Matthew Sanford.* Understanding and treating eye diseases: mechanical characterization and photochemical modification of the cornea and sclera: Ph.D. thesis / California Institute of Technology. — 2008.
61. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes / N. S. Malik, S. J. Moss, N. Ahmed et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. — 1992. — Vol. 1138, no. 3. — Pp. 222–228.
62. *Spoerl E., Huhle M., Seiler T.* Induction of cross-links in corneal tissue // *Experimental eye research*. — 1998. — Vol. 66, no. 1. — Pp. 97–103.
63. Manifest diabetes and keratoconus: a retrospective case-control study / T. Seiler, S. Huhle, E. Spoerl, H. Kunath // *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. — 2000. — Vol. 238, no. 10. — Pp. 822–825.
64. *Avery N. C., Bailey A. J.* Restraining cross-links responsible for the mechanical properties of collagen fibers: natural and artificial // *Collagen: structure and mechanics*. — Springer, 2008. — Pp. 81–110.
65. *Zeeman R.* Cross-linking of collagen-based materials: Ph.D. thesis / Universiteit Twente, Enschede, The Netherlands. — 1998.

66. Stabilization of scleral collagen by glycerol aldehyde cross-linking / N. A. Danilov, N. Yu. Ignatieva, E. N. Iomdina et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. — 2008. — Vol. 1780, no. 5. — Pp. 764–772.
67. Weadock K., Olson R. M., Silver F. H. Evaluation of collagen crosslinking techniques // *Biomaterials, medical devices, and artificial organs*. — 1983. — Vol. 11, no. 4. — Pp. 293–318.
68. Увеличение стабильности склерального коллагена в ходе гликозилирования трезой *in vitro* / Н. А. Данилов, Н. Ю. Игнатьева, Е. Н. Иомдина и др. // *Журнал физической химии*. — 2010. — Т. 84, № 1. — С. 131–137.
69. Sorkin N., Varssano D. Corneal collagen crosslinking: a systematic review // *Ophthalmologica*. — 2014. — Vol. 232, no. 1. — Pp. 10–27.
70. Экспериментальное изучение состава для медикаментозного кросслинкинга роговицы как перспективного средства лечения кератоконуса / Е. Н. Иомдина, А. Р. Коригодский, И. П. Хорошилова-Маслова и др. // *Российский офтальмологический журнал*. — 2017. — Т. 10, № 4. — С. 54–61.
71. Изменение термодинамических характеристик денатурации коллагена тканей глаза в результате неферментативной гликации / Н. Ю. Игнатьева, Н. А. Данилов, В. В. Лунин и др. // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. — 2007. — Т. 48, № 2.
72. Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking / Y. Tanaka, A. Kubota, M. Yamato et al. // *Biomaterials*. — 2011. — Vol. 32, no. 4. — Pp. 1080–1090.
73. Wollensak G., Iomdina E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glycerinaldehyde // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2008. — Vol. 34, no. 4. — Pp. 651–656.
74. Экспериментальная реализация малоинвазивных технологий кросслинкинга склеры / Е. Н. Иомдина, Е. П. Тарутта, В. А. Семчишен и др. // *Вестник офтальмологии*. — 2016. — Т. 132, № 6. — С. 49–58.
75. Evaluation of therapeutic tissue crosslinking (TXL) for myopia using second harmonic generation signal microscopy in rabbit sclera / M. Zyablitskaya, A. Takaoka, E. L. Munteanu et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2017. — Vol. 58, no. 1. — Pp. 21–29.

76. Применение ультрафиолетового корнеального кросслинкинга при язвах роговицы и других кератопатиях у животных / Е. Н. Иомдина, Л. Ф. Сотникова, А. В. Гончарова и др. // *Российский офтальмологический журнал*. — 2019. — Т. 12, № 3. — С. 51–57.
77. Ultrasound-enhanced penetration of topical riboflavin into the corneal stroma / R. Lamy, E. Chan, H. Zhang et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2013. — Vol. 54, no. 8. — Pp. 5908–5912.
78. *Bikbova G., Bikbov M.* Transepithelial corneal collagen cross-linking by iontophoresis of riboflavin // *Acta ophthalmologica*. — 2014. — Vol. 92, no. 1. — Pp. e30–e34.
79. Effect of complete epithelial debridement before riboflavin–ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy / S. Hayes, D. P. O’Brart, L. S. Lamdin et al. // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2008. — Vol. 34, no. 4. — Pp. 657–661.
80. *Wollensak G., Iomdina E.* Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2009. — Vol. 35, no. 3. — Pp. 540–546.
81. Epithelium-off corneal collagen cross-linking versus transepithelial cross-linking for pediatric keratoconus / A. Magli, R. Forte, A. Tortori et al. // *Cornea*. — 2013. — Vol. 32, no. 5. — Pp. 597–601.
82. Pharmacological modification of the epithelial permeability by benzalkonium chloride in UVA/Riboflavin corneal collagen cross-linking / A. Kissner, E. Spoerl, R. Jung et al. // *Current Eye Research*. — 2010. — Vol. 35, no. 8. — Pp. 715–721.
83. *Иомдина Е. Н.* Биомеханические аспекты кераторефракционной хирургии и корнеального кросслинкинга // *Российская педиатрическая офтальмология*. — 2015. — Т. 10, № 4. — С. 32–37.
84. Morphological modification of the cornea after standard and transepithelial corneal cross-linking as imaged by anterior segment optical coherence tomography and laser scanning *in vivo* confocal microscopy / L. Mastropasqua, M. Nubile, M. Lanzini et al. // *Cornea*. — 2013. — Vol. 32, no. 6. — Pp. 855–861.
85. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratoconus: *in vivo* confocal microscopic evaluation / C. Mazzotta, A. Balestrazzi, S. Baiocchi et al. // *Clinical & experimental ophthalmology*. — 2007. — Vol. 35, no. 6. — Pp. 580–582.

86. *Filippello M., Stagni E., O'Brart D.* Transepithelial corneal collagen crosslinking: bilateral study // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2012. — Vol. 38, no. 2. — Pp. 283–291.
87. Management of Early Progressive Corneal Ectasia: Accelerated Crosslinking Principles / C. Mazzotta, F. Raiskup, S. Baiocchi et al. — Springer, 2017. — P. 214.
88. *Chan C. C. K., Sharma M., Wachler B. S. B.* Effect of inferior-segment Intacs with and without C3-R on keratoconus // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2007. — Vol. 33, no. 1. — Pp. 75–80.
89. *Wollensak G., Spoerl E., Seiler T.* Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // *American journal of ophthalmology*. — 2003. — Vol. 135, no. 5. — Pp. 620–627.
90. Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and long-wavelength ultraviolet radiation (UVA) / A. S. McCall, S. Kraft, H. F. Edelhauser et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2010. — Vol. 51, no. 1. — Pp. 129–138.
91. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A / G. Wollensak, H. Aurich, D. T. Pham, C. Wirbelauer // *Journal of cataract & refractive surgery*. — 2007. — Vol. 33, no. 3. — Pp. 516–521.
92. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium / S. Baiocchi, C. Mazzotta, D. Cerretani et al. // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2009. — Vol. 35, no. 5. — Pp. 893–899.
93. *Snibson G. R.* Collagen cross-linking: a new treatment paradigm in corneal disease—a review // *Clinical & experimental ophthalmology*. — 2010. — Vol. 38, no. 2. — Pp. 141–153.
94. *Букбов М. М., Суркова В. К.* Метод перекрестного связывания коллагена роговицы при кератоконусе. Обзор литературы // *Офтальмология*. — 2014. — Т. 11, № 3. — С. 13–19.
95. *Alhayek A., Lu P. R.* Corneal collagen crosslinking in keratoconus and other eye disease // *International journal of ophthalmology*. — 2015. — Vol. 8, no. 2. — P. 407.
96. *Родин А. С., Брижак П. Е.* Перспективы применения метода кросслинкинга коллагена роговицы в лечении кератоконуса и кератоконусов // *Рефракционная хирургия и офтальмология*. — 2008. — Т. 8, № 4. — С. 14–23.

97. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea / E. Spoerl, M. Mrochen, D. Sliney et al. // *Cornea*. — 2007. — Vol. 26, no. 4. — Pp. 385–389.
98. *Raiskup F., Spoerl E.* Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles // *The ocular surface*. — 2013. — Vol. 11, no. 2. — Pp. 65–74.
99. Кросслинкинг склеры с рибофлавином и ультрафиолетом А (UVA). Обзор литературы / М. М. Бикбов, В. К. Суркова, Э. Л. Усубов, М. Н. Астрелин // *Офтальмология*. — 2016. — Т. 12, № 4. — С. 4–8.
100. *Бикбов М. М., Халимов А. Р., Усубов Э. Л.* Ультрафиолетовый кросслинкинг роговицы // *Вестник Российской академии медицинских наук*. — 2016. — Т. 71, № 3. — С. 224–232.
101. Corneal crosslinking with rose bengal and green light: efficacy and safety evaluation / H. Zhu, C. Alt, R. H. Webb et al. // *Cornea*. — 2016. — Vol. 35, no. 9. — Pp. 1234–1241.
102. The ultrastructure of rabbit sclera after scleral crosslinking with riboflavin and blue light of different intensities / A. Karl, F. N. Makarov, C. Koch et al. // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. — 2016. — Vol. 254, no. 8. — Pp. 1567–1577.
103. Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness / D. Cherman, E. E. Verter, S. Melki et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2013. — Vol. 54, no. 5. — Pp. 3426–3433.
104. *Wollensak G., Spoerl E., Seiler T.* Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2003. — Vol. 29, no. 9. — Pp. 1780–1785.
105. *Гамидов Г. А., Мушкова И. А., Костенев С. В.* Модификации кроссликинга роговичного коллагена в лечении кератоконуса. Обзор литературы // *Практическая медицина*. — 2018. — Т. 3, № 114. — С. 52–56.
106. *Zhang Y., Conrad A. H., Conrad G. W.* Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking // *Journal of Biological Chemistry*. — 2011. — Vol. 286, no. 15. — Pp. 13011–13022.
107. Potential use of riboflavin/UVA cross-linking in bullous keratopathy / G. Wollensak, H. Aurich, C. Wirbelauer, D. T. Pham // *Ophthalmic research*. — 2009. — Vol. 41, no. 2. — Pp. 114–117.

108. The effect of riboflavin/UVA collagen cross-linking therapy on the structure and hydrodynamic behaviour of the ungulate and rabbit corneal stroma / S. Hayes, C. S. Kamma-Lorger, C. Boote et al. // *PloS one*. — 2013. — Vol. 8, no. 1. — P. e52860.
109. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA / G. Wollensak, M. Wilsch, E. Spoerl, T. Seiler // *Cornea*. — 2004. — Vol. 23, no. 5. — Pp. 503–507.
110. *Spoerl E., Boehm A. G., Pillunat L. E.* The influence of various substances on the biomechanical behavior of lamina cribrosa and peripapillary sclera // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2005. — Vol. 46, no. 4. — Pp. 1286–1290.
111. *Meek K. M., Hayes S.* Corneal cross-linking—a review // *Ophthalmic and Physiological Optics*. — 2013. — Vol. 33, no. 2. — Pp. 78–93.
112. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of progressive myopia in a rabbit model / A. Dotan, I. Kremer, T. Livnat et al. // *Experimental eye research*. — 2014. — Vol. 127. — Pp. 190–195.
113. *Morgan I. G., Ohno-Matsui K., Saw S. M.* Myopia // *The Lancet*. — 2012. — Vol. 379, no. 9827. — Pp. 1739–1748.
114. Scleral cross-linking by riboflavin and blue light application in young rabbits: damage threshold and eye growth inhibition / H. P. Iseli, N. Körber, C. Koch et al. // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. — 2016. — Vol. 254, no. 1. — Pp. 109–122.
115. Changes in corneal biomechanical properties with different corneal cross-linking irradiances / F. J. Bao, Y. R. Zheng, C. Liu et al. // *Journal of Refractive Surgery*. — 2018. — Vol. 34, no. 1. — Pp. 51–58.
116. Qualitative investigation of corneal changes after accelerated corneal collagen cross-linking (A-CXL) by *in vivo* confocal microscopy and corneal OCT / C. Mazzotta, A. L. Paradiso, S. Baiocchi et al. // *J Clin Exp Ophthalmol*. — 2013. — Vol. 4, no. 6. — P. 1000313.
117. *Kanellopoulos A. J., Krueger R. R., Asimellis G.* Cross-linking and corneal imaging advances // *BioMed research international*. — 2015. — Vol. 2015.
118. High-irradiance CXL combined with myopic LASIK: flap and residual stroma biomechanical properties studied *ex-vivo* / A. J. Kanellopoulos, G. Asimellis, B. Salvador-Culla et al. // *British Journal of Ophthalmology*. — 2015. — Vol. 99, no. 6. — Pp. 870–874.

119. Оценка биомеханических свойств роговицы до и после современных модификаций кератопластики у больных с буллезной кератопатией / С. В. Труфанов, А. А. Антонов, С. А. Маложен, В. И. Сипливый // *Вестник офтальмологии*. — 2015. — Vol. 131, no. 6. — Pp. 20–25.
120. *Calkins J. L., Hochheimer B. F., Stark W. J.* Corneal wound healing: holographic stress-test analysis. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 1981. — Vol. 21, no. 2. — Pp. 322–334.
121. *Smolek M.* Elasticity of the bovine sclera measured with real-time holographic interferometry. // *American journal of optometry and physiological optics*. — 1988. — Vol. 65, no. 8. — Pp. 653–660.
122. *Cartwright N. E. K., Tyrer J. R., Marshall J.* Age-related differences in the elasticity of the human cornea // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2011. — Vol. 52, no. 7. — Pp. 4324–4329.
123. Interferometric technique to measure biomechanical changes in the cornea induced by refractive surgery / P. D. Jaycock, L. Lobo, J. Ibrahim et al. // *Journal of cataract & refractive surgery*. — 2005. — Vol. 31, no. 1. — Pp. 175–184.
124. Method for optical coherence elastography of the cornea / M. R. Ford, W. J. Dupps, A. M. Rollins et al. // *Journal of biomedical optics*. — 2011. — Vol. 16, no. 1. — P. 016005.
125. Assessing the effects of riboflavin/UV-A crosslinking on porcine corneal mechanical anisotropy with optical coherence elastography / M. Singh, J. Li, Z. Han et al. // *Biomedical optics express*. — 2017. — Vol. 8, no. 1. — Pp. 349–366.
126. *Scarcelli G., Yun S. H.* Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging // *Nature photonics*. — 2008. — Vol. 2, no. 1. — Pp. 39–43.
127. *Scarcelli G., Yun S. H.* In vivo Brillouin optical microscopy of the human eye // *Optics express*. — 2012. — Vol. 20, no. 8. — Pp. 9197–9202.
128. *Bailey A. J., Peach C. M., Fowler L. J.* Chemistry of the collagen cross-links. Isolation and characterization of two intermediate intermolecular cross-links in collagen // *Biochemical Journal*. — 1970. — Vol. 117, no. 5. — Pp. 819–831.
129. *Иомдина Е. Н., Арутюнян Л. Л., Игнатьева Н. Ю.* Сравнительное изучение возрастных особенностей уровня поперечной связанности коллагена склеры пациентов

- с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы // *Российский офтальмологический журнал*. — 2016. — Vol. 9, no. 1. — Pp. 19–26.
130. Иомдина Е. Н., Назаренко Л. А., Киселева О. А. Изучение связи биомеханических свойств склеры и гидродинамики глаза в эксперименте // *Вестник Нижегородского университета им. НИ Лобачевского*. — 2011. — № 4-2.
131. Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion // *Current eye research*. — 2004. — Vol. 29, no. 1. — Pp. 35–40.
132. Corneal cross-linking with riboflavin and UV-A in the mouse cornea *in vivo*: morphological, biochemical, and physiological analysis / S. Kling, A. Hammer, A. Conti, F. Hafezi // *Translational vision science & technology*. — 2017. — Vol. 6, no. 1. — P. 7.
133. An investigation of the effects of riboflavin concentration on the efficacy of corneal cross-linking using an enzymatic resistance model in porcine corneas / N. A. L. O’Brart, D. P. S. O’Brart, N. H. Aldahlawi et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2018. — Vol. 59, no. 2. — Pp. 1058–1065.
134. The effect of hydration and matrix composition on solute diffusion in rabbit sclera / O. A. Boubriak, J. P. G. Urban, S. Akhtar et al. // *Experimental eye research*. — 2000. — Vol. 71, no. 5. — Pp. 503–514.
135. Correlation between multimodal microscopy, tissue morphology, and enzymatic resistance in riboflavin-UVA cross-linked human corneas / M. Lagner, A. Pollreisz, G. Schmidinger et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2015. — Vol. 56, no. 6. — Pp. 3584–3592.
136. Клинические результаты лечения кератоконуса методом трансэпителиального кросслинкинга роговичного коллагена / М. М. Бикбов, В. К. Суркова, Г. М. Бикбова, Н. Б. Зайнуллина // *Офтальмология*. — 2016. — Vol. 13, no. 1. — Pp. 4–9.
137. Солодкова Е. Г. Модифицированная методика кросслинкинга роговичного коллагена с точечной дозированной эксимерной лазерной дезэпителизацией: Ph.D. thesis / Федеральное государственное автономное учреждение «Межотраслевой Научно – Технический Комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. — 2016.

138. Krueger R. R., Ramos-Esteban J. C., Kanellopoulos A. J. Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case // *Journal of Refractive Surgery*. — 2008. — Vol. 24, no. 7. — Pp. S730–S736.
139. Corneal biomechanical properties at different corneal cross-linking (CXL) irradiances / A. Hammer, O. Richo, S. A. Mosquera et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2014. — Vol. 55, no. 5. — Pp. 2881–2884.
140. All-optical method to assess stromal concentration of riboflavin in conventional and accelerated UV-A irradiation of the human cornea / G. Lombardo, N. L. Micali, V. Villari et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2016. — Vol. 57, no. 2. — Pp. 476–483.
141. Lin J. T., Cheng D. C. Modeling the efficacy profiles of UV-light activated corneal collagen crosslinking // *PLoS ONE*. — 2017. — Vol. 12, no. 4. — P. e0175002.
142. Photochemical kinetics of corneal cross-linking with riboflavin / P. Kamaev, M. D. Friedman, E. Sherr, D. Muller // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2012. — Vol. 53, no. 4. — Pp. 2360–2367.
143. Influence of corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A irradiation on excimer laser surgery / D. Kampik, B. Ralla, S. Keller et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2010. — Vol. 51, no. 8. — Pp. 3929–3934.
144. Corneal distribution of riboflavin prior to collagen cross-linking / A. P. Søndergaard, J. Hjortdal, T. Breitenbach, A. Ivarsen // *Current eye research*. — 2010. — Vol. 35, no. 2. — Pp. 116–121.
145. Response to “Correlation Between UV Absorption and Riboflavin Concentration in Different Depths of the Cornea in CXL” by Spoerl et al. / A. P. Søndergaard, J. Hjortdal, T. Breitenbach, A. Ivarsen // *Current Eye Research*. — 2010. — Vol. 35, no. 11. — Pp. 1042–1043.
146. High-resolution, noninvasive, two-photon fluorescence measurement of molecular concentrations in corneal tissue / L. Cui, K. R. Huxlin, L. Xu et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2011. — Vol. 52, no. 5. — Pp. 2556–2564.
147. Two-photon fluorescence microscopy of corneal riboflavin absorption / D. M. Gore, A. Margineanu, P. French et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2014. — Vol. 55, no. 4. — Pp. 2476–2481.

148. Transepithelial riboflavin absorption in an ex vivo rabbit corneal model / D. M. Gore, D. O'Brart, P. French et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2015. — Vol. 56, no. 8. — Pp. 5006–5011.
149. Two-photon fluorescence microscopy of corneal riboflavin absorption through an intact epithelium / D. M. Gore, P. French, D. O'Brart et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2015. — Vol. 56, no. 2. — Pp. 1191–1192.
150. Two-photon fluorescence microscopy for determination of the riboflavin concentration in the anterior corneal stroma when using the dresden protocol / T. G. Seiler, T. Ehmke, I. Fischinger et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2015. — Vol. 56, no. 11. — Pp. 6740–6746.
151. Non-invasive optical method for real-time assessment of intracorneal riboflavin concentration and efficacy of corneal cross-linking / G. Lombardo, V. Villari, N. L. Micali et al. // *Journal of biophotonics*. — 2018. — Vol. 11, no. 7. — P. e201800028.
152. *Lombardo M., Lombardo G.* Noninvasive real-time assessment of riboflavin consumption in standard and accelerated corneal crosslinking // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2019. — Vol. 45, no. 1. — Pp. 80–86.
153. Corneal Cross-linking: Evaluating the Potential for a Lower Power, Shorter Duration treatment / C. Caruso, G. Barbaro, R. L. Epstein et al. // *Cornea*. — 2016. — Vol. 35, no. 5. — P. 659.
154. Aggregation and photoreduction in anaerobic solutions of flavin mononucleotide / P. Kamaev, M. Smirnov, M. Friedman et al. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. — 2015. — Vol. 310. — Pp. 60–65.
155. Author Response: The Role of Riboflavin Concentration and Oxygen in the Efficacy and Depth of Corneal Crosslinking / D. P. S. O'Brart, N. A. L. O'Brart, N. H. Aldahlawi et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2018. — Vol. 59, no. 11. — Pp. 4451–4452.
156. *Lin J. T.* Efficacy S-formula and Kinetics of Non-oxygen-mediated (Type-I) and Oxygen-mediated (Type-II) Corneal Cross-linking // *Ophthalmology Research: An International Journal*. — 2018. — Pp. 1–11.

157. *Lin J. T.* A critical review on the kinetics, efficacy, safety, nonlinear law and optimal protocols of corneal cross-linking // *Journal of Ophthalmology & Visual Neurosciences*. — 2018. — Vol. 3, no. 1. — P. 017.
158. *Lin J. T.* The role of riboflavin concentration and oxygen in the efficacy and depth of corneal crosslinking // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2018. — Vol. 59, no. 11. — Pp. 4449–4450.
159. *Lin J. T.* A proposed concentration-controlled new protocol for optimal corneal crosslinking efficacy in the anterior stroma // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2018. — Vol. 59, no. 1. — Pp. 431–432.
160. Optimization model for UV-riboflavin corneal cross-linking / S. Schumacher, M. Mrochen, J. Wernli et al. // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. — 2012. — Vol. 53, no. 2. — Pp. 762–769.
161. Interaction of ultraviolet light with the cornea: clinical implications for corneal crosslinking / M. Lombardo, G. Pucci, R. Barberi, G. Lombardo // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2015. — Vol. 41, no. 2. — Pp. 446–459.
162. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin / M. A. Sheraz, S. H. Kazi, S. Ahmed et al. // *Beilstein journal of organic chemistry*. — 2014. — Vol. 10, no. 1. — Pp. 1999–2012.
163. Multicomponent spectrometric analysis of riboflavin and photoproducts and their kinetic applications / M. A. Sheraz, S. H. Kazi, S. Ahmed et al. // *Central European Journal of Chemistry*. — 2014. — Vol. 12, no. 6. — Pp. 635–642.
164. Multicomponent spectrofluorimetric method for the assay of formylmethylflavin and its hydrolytic products: Kinetic applications / I. Ahmad, T. Mirza, Z. Anwar et al. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2018. — Vol. 205. — Pp. 540–550.
165. *Song S. H., Dick B., Penzkofer A.* Photo-induced reduction of flavin mononucleotide in aqueous solutions // *Chemical physics*. — 2007. — Vol. 332, no. 1. — Pp. 55–65.
166. *Charulatha V., Rajaram A.* Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes // *Biomaterials*. — 2003. — Vol. 24, no. 5. — Pp. 759–767.

167. Structural response of human corneal and scleral tissues to collagen cross-linking treatment with riboflavin and ultraviolet A light / S. Choi, S. C. Lee, H. J. Lee et al. // *Lasers in medical science*. — 2013. — Vol. 28, no. 5. — Pp. 1289–1296.
168. *Elsheikh A., Phillips J. R.* Is scleral cross-linking a feasible treatment for myopia control? // *Ophthalmic and Physiological Optics*. — 2013. — Vol. 33, no. 3. — Pp. 385–389.
169. *Тучин В. В.* Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2013. — С. 812.
170. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования *ex vivo* и *in vivo* / Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, Ю. П. Синичкин, В. В. Тучин // *Оптика и спектроскопия*. — 2010. — Т. 109, № 2. — С. 256–263.
171. Light propagation in tissues with controlled optical properties / V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov et al. // *Journal of biomedical optics*. — 1997. — Vol. 2, no. 4. — Pp. 401–418.
172. Human sclera dynamic spectra: *in-vitro* and *in-vivo* measurements / A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, E. A. Genina et al. // *Ophthalmic Technologies IX / International Society for Optics and Photonics*. — Vol. 3591. — 1999. — Pp. 311–319.
173. Scleral tissue clearing effects / V. V. Tuchin, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Y. P. Sinichkin // *Ophthalmic Technologies XII / International Society for Optics and Photonics*. — Vol. 4611. — 2002. — Pp. 54–58.
174. Changes in morphology and optical properties of sclera and choroidal layers due to hyperosmotic agent / R. T. Zaman, B. S. Nichols, H. G. Rylander et al. // *Journal of biomedical optics*. — 2011. — Vol. 16, no. 7. — P. 077008.
175. *Швачкина М. Е., Правдин А. Б.* Влияние оптического просветления на оптические и механические свойства склеры // Бюллетень медицинских интернет-конференций / Общество с ограниченной ответственностью Наука и инновации. — Т. 5. — 2015.
176. *Shvachkina M. E., Knyazkova A. I., Sandykova E. A.* Influence of optical clearing on collagen crosslinking of sclera // *Journal of Physics: Conference Series / IOP Publishing*. — Vol. 1145. — 2019. — P. 012056.

177. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research / F. De Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard et al. // *Nature methods*. — 2012. — Vol. 9, no. 7. — Pp. 690–696.
178. *Bueno J. M., Ávila F. J., Martínez-García M. C.* Quantitative analysis of the corneal collagen distribution after *in vivo* cross-linking with second harmonic microscopy // *BioMed research international*. — 2019. — Vol. 2019.
179. *McQuaid R. M.* Diffusion of oxygen and riboflavin during corneal cross-linking (CXL): Ph.D. thesis / University College Dublin. School of Physics. — 2017.
180. *Green M.* Photo-induced reactions of flavins: Ph.D. thesis / The university of arizona. — 1967.
181. *Константинова-Шлезингер М. А.* Люминесцентный анализ. — Физматгиз, 1961.
182. *Smith E. C.* The photochemical degradation of riboflavin: Ph.D. thesis / Iowa State University Of Science and Technology. — 1963.
183. *Tether L. R., Turnbull J. H.* Excited states of flavin coenzymes. Influence of structural factors on the reactivity of excited flavins // *Biochemical Journal*. — 1962. — Vol. 85, no. 3. — P. 517.
184. Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution / W. Holzer, J. Shirdel, P. Zirak et al. // *Chemical physics*. — 2005. — Vol. 308, no. 1-2. — Pp. 69–78.
185. *Kozioł J., Knobloch E.* The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*. — 1965. — Vol. 102, no. 1. — Pp. 289–300.
186. *Tyagi A., Penzkofer A.* Absorption and emission spectroscopic characterization of lumichrome in aqueous solutions // *Photochemistry and photobiology*. — 2011. — Vol. 87, no. 3. — Pp. 524–533.
187. *Шнайдман Л. О.* Производство витаминов. — М.: Пищевая промышленность, 1973. — С. 443.
188. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution / P. Drössler, W. Holzer, A. Penzkofer, P. Hegemann // *Chemical Physics*. — 2002. — Vol. 282, no. 3. — Pp. 429–439.

189. Effect of pH, buffer, and viscosity on the photolysis of formylmethylflavin: a kinetic study / I. Ahmad, T. Mirza, K. Iqbal et al. // *Australian Journal of Chemistry*. — 2013. — Vol. 66, no. 5. — Pp. 579–585.
190. Ahmad I., Fasihullah Q., Vaid F. H. M. Effect of phosphate buffer on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2005. — Vol. 78, no. 3. — Pp. 229–234.
191. Ahmad I., Fasihullah Q., Vaid F. H. M. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2006. — Vol. 82, no. 1. — Pp. 21–27.
192. Penzkofer A. Photoluminescence behavior of riboflavin and lumiflavin in liquid solutions and solid films // *Chemical Physics*. — 2012. — Vol. 400. — Pp. 142–153.
193. Assessment of stromal riboflavin concentration–depth profile in nanotechnology-based transepithelial corneal crosslinking / G. Lombardo, N. L. Micali, V. Villari et al. // *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. — 2017. — Vol. 43, no. 5. — Pp. 680–686.
194. Berezin M. Y., Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging // *Chemical reviews*. — 2010. — Vol. 110, no. 5. — Pp. 2641–2684.
195. König K. Clinical multiphoton tomography // *Journal of biophotonics*. — 2008. — Vol. 1, no. 1. — Pp. 13–23.
196. Koenig K. Hybrid multiphoton multimodal tomography of *in vivo* human skin // *IntraVital*. — 2012. — Vol. 1, no. 1. — Pp. 11–26.
197. Multiphoton multispectral fluorescence lifetime tomography for the evaluation of basal cell carcinomas / R. Patalay, C. Talbot, Y. Alexandrov et al. // *PLoS one*. — 2012. — Vol. 7, no. 9. — P. e43460.
198. Quantitative assessment of UVA-riboflavin corneal cross-linking using nonlinear optical microscopy / D. Chai, R. N. Gaster, R. Roizenblatt et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2011. — Vol. 52, no. 7. — Pp. 4231–4238.
199. Определение коэффициента диффузии глюкозы в склере глаза человека / А. Н. Башкатов, Э. А. Генина, Ю. П. Синичкин и др. // *Биофизика*. — 2003. — Т. 48, № 2. — С. 309–313.

200. Ларин К. В., Тучин В. В. Функциональная визуализация и оценка скорости диффузии глюкозы в эпителиальных тканях с помощью оптической когерентной томографии // *Квантовая электроника*. — 2008. — Т. 38, № 6. — С. 551–556.
201. *Ex vivo* optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin / D. K. Tuchina, R. Shi, A. N. Bashkatov et al. // *Journal of Biophotonics*. — 2015. — Vol. 8, no. 4. — Pp. 332–346.
202. Quantitative mapping of collagen fiber alignment in thick tissue samples using transmission polarized-light microscopy / D. D. Yakovlev, M. E. Shvachkina, M. M. Sherman et al. // *Journal of biomedical optics*. — 2016. — Vol. 21, no. 7. — P. 071111.
203. Оценка характеристик двулучепреломления коллагеносодержащих тканей с помощью поляризационного картографирования и ОКТ / М. Е. Швачкина, Д. Д. Яковлев, А. Б. Правдин, Яковлев Д. А. // Сборник трудов X Международной конференции молодых ученых и специалистов «Оптика – 2017». — СПб: Университет ИТМО, 2017. — С. 583–585.
204. Мониторинг изменения размеров и средних показателей преломления и двулучепреломления коллагеновых пучков при иммерсионном оптическом просветлении с помощью томографа THORLABS-ОСР930SR / М. Е. Швачкина, Д. Д. Яковлев, А. Б. Правдин, Д. А. Яковлев // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2017: материалы Международного симпозиума и Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2017. — Саратов : Изд - во «Новый ветер», 2017. — С. 28–35.
205. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing / A. N. Bashkatov, K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy et al. // *Journal of Biomedical Optics*. — 2018. — Vol. 23, no. 9. — P. 091416.
206. Average refractive index of tendon as a function of water content / M. E. Shvachkina, D. D. Yakovlev, A. B. Pravdin, D. A. Yakovlev // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2018. — Vol. 4, no. 1. — P. 010302.
207. Мониторинг процесса иммерсионного оптического просветления коллагеновых волокон с помощью оптической когерентной томографии / М. Е. Швачкина, Д. Д. Яковлев, Е. Н. Лазарева и др. // *Оптика и спектроскопия*. — 2019. — Т. 127, № 2. — С. 337–346.

208. Variation of corneal refractive index with hydration / Y. L. Kim, J. T. Walsh Jr, T. K. Goldstick, M. R. Glucksberg // *Physics in Medicine & Biology*. — 2004. — Vol. 49, no. 5. — Pp. 859–868.
209. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography / G. J. Tearney, M. E. Brezinski, J. F. Southern et al. // *Optics letters*. — 1995. — Vol. 20, no. 21. — Pp. 2258–2260.
210. Sorin W. V., Gray D. F. Simultaneous thickness and group index measurement using optical low-coherence reflectometry // *Ieee Photonics Technology Letters*. — 1992. — Vol. 4, no. 1. — Pp. 105–107.
211. Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry / X. J. Wang, T. E. Milner, M. C. Chang, J. S. Nelson // *Journal of biomedical optics*. — 1996. — Vol. 1, no. 2. — Pp. 212–217.
212. Group refractive index measurement by Michelson interferometer / Z. Bor, K. Osvay, B. Rácz, G. Szabó // *Optics Communications*. — 1990. — Vol. 78, no. 2. — Pp. 109–112.
213. Born M., Wolf E. Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. — Cambridge University Press, 1999.
214. Segelstein D. J. The complex refractive index of water: Ph.D. thesis / University of Missouri–Kansas City. — 1981.
215. De Boer J. F., Milner T. E. Review of polarization sensitive optical coherence tomography and Stokes vector determination // *Journal of biomedical optics*. — 2002. — Vol. 7, no. 3. — Pp. 359–372.
216. Interaction of water with native collagen / S. Nomura, A. Hiltner, J. B. Lando, E. Baer // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. — 1977. — Vol. 16, no. 2. — Pp. 231–246.
217. Leonard D. W., Meek K. M. Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma // *Biophysical journal*. — 1997. — Vol. 72, no. 3. — Pp. 1382–1387.
218. Katz E. P., Li S. T. Structure and function of bone collagen fibrils // *Journal of molecular biology*. — 1973. — Vol. 80, no. 1. — Pp. 1–15.
219. Synchrotron x-ray diffraction studies of the cornea, with implications for stromal hydration / K. M. Meek, N. J. Fullwood, P. H. Cooke et al. // *Biophysical journal*. — 1991. — Vol. 60, no. 2. — Pp. 467–474.

220. *Morin C., Hellmich C., Henits P.* Fibrillar structure and elasticity of hydrating collagen: a quantitative multiscale approach // *Journal of theoretical biology.* — 2013. — Vol. 317. — Pp. 384–393.
221. The structural response of the cornea to changes in stromal hydration / S. Hayes, T. White, C. Boote et al. // *Journal of The Royal Society Interface.* — 2017. — Vol. 14, no. 131. — P. 20170062.
222. *Aldrovani M., Guaraldo A. M. A., Vidal B. C.* Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice // *Vision research.* — 2007. — Vol. 47, no. 26. — Pp. 3229–3237.
223. *Hemenger R. P.* Birefringence of a medium of tenuous parallel cylinders // *Applied Optics.* — 1989. — Vol. 28, no. 18. — Pp. 4030–4034.
224. *Riley G.* The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective // *Rheumatology.* — 2003. — Vol. 43, no. 2. — Pp. 131–142.
225. Reversible dissociation of collagen in tissues / A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, B. J. Tromberg // *Journal of Investigative Dermatology.* — 2003. — Vol. 121, no. 6. — Pp. 1332–1335.
226. *Швачкина М. Е.* О возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика.* — 2019. — Т. 19, № 3. — С. 210–222.
227. Determination of collagen fiber orientation in histological slides using Mueller microscopy and validation by second harmonic generation imaging / S. Bancelin, A. Nazac, B. H. Ibrahim et al. // *Optics express.* — 2014. — Vol. 22, no. 19. — Pp. 22561–22574.
228. *Tower T. T., Tranquillo R. T.* Alignment maps of tissues: I. Microscopic elliptical polarimetry // *Biophysical journal.* — 2001. — Vol. 81, no. 5. — Pp. 2954–2963.
229. *Tower T. T., Tranquillo R. T.* Alignment maps of tissues: II. Fast harmonic analysis for imaging // *Biophysical journal.* — 2001. — Vol. 81, no. 5. — Pp. 2964–2971.
230. *Wolman M.* Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* — 1975. — Vol. 23, no. 1. — Pp. 21–50.

231. Характеризация коллагено-содержащих тканей методами поляризационной микроскопии / М. Е. Швачкина, Д. А. Яковлев, А. Б. Правдин, Д. Д. Яковлев // XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов. — Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2015. — С. 134–143.
232. Оценка возможностей трансмиссионного поляризационного картографирования для характеристики макроструктуры склеры / М. Е. Швачкина, А. Б. Правдин, Д. А. Тихонов и др. // *Саратовский научно-медицинский журнал*. — 2017. — Т. 13, № 2. — С. 435–441.
233. *Yarker Y. E., Aspden R. M., Hukins D. W. L.* Birefringence of articular cartilage and the distribution of collagen fibril orientations // *Connective tissue research*. — 1983. — Vol. 11, no. 2-3. — Pp. 207–213.
234. *Naylor E. J.* The structure of the cornea as revealed by polarized light // *Journal of Cell Science*. — 1953. — Vol. 3, no. 25. — Pp. 83–88.
235. *Спивак А. В.* Исследование влияния оптической анизотропии рассеивающих сред на поляризационные характеристики рассеянного света: Ph.D. thesis / Саратовский государственный университет им. НГ Чернышевского. — 2009.
236. *Yakovlev D. A., Chigrinov V. G., Kwok H. S.* Modeling and optimization of LCD optical performance. — John Wiley & Sons, 2015.
237. *Синичкин Ю. П., Спивак А. В., Яковлев Д. А.* Простые параметрические представления поляризационно-оптических свойств двулучепреломляющих биотканей в рамках методов отражательной поляризационной спектроскопии // *Оптика и спектроскопия*. — 2009. — Т. 107, № 6. — С. 922–933.
238. *Синичкин Ю. П., Спивак А. В., Яковлев Д. А.* Влияние анизотропии рассеяния и материальной оптической анизотропии слоев ориентированных волокон на состояние поляризации проходящего света // *Оптика и спектроскопия*. — 2010. — Т. 109, № 2. — С. 197–205.
239. *Yakovlev D. A., Chigrinov V. G.* A robust polarization-spectral method for determination of twisted liquid crystal layer parameters // *Journal of Applied Physics*. — 2007. — Vol. 102, no. 2. — P. 023510.

240. Правдин А. Б., Спивак В. А., Яковлев Д. А. О возможности неинвазивного поляриметрического определения содержания глюкозы в коже // *Оптика и спектроскопия*. — 2016. — Т. 120, № 1. — С. 53–58.
241. Aben H. K. Optical phenomena in photoelastic models by the rotation of principal axes // *Experimental Mechanics*. — 1966. — Vol. 6, no. 1. — Pp. 13–22.
242. Aben H. K. Characteristic directions in optics of twisted birefringent media // *J. Opt. Soc. Am. A*. — 1986. — Vol. 3, no. 9. — Pp. 1414–1421.
243. Allia P., Oldano C., Trossi L. Polarization transfer matrix for the transmission of light through liquid-crystal slabs // *JOSA B*. — 1988. — Vol. 5, no. 12. — Pp. 2452–2461.
244. Yakovlev D. A. Calculation of transmission characteristics of smoothly inhomogeneous anisotropic media in the approximation of negligible smallness of the bulk reflection: III. Analytical solutions // *Optics and Spectroscopy*. — 2003. — Vol. 95, no. 6. — Pp. 944–951.
245. Bullough P., Goodfellow J. The significance of the fine structure of articular cartilage // *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. — 1968. — Vol. 50, no. 4. — Pp. 852–857.
246. Шерман М. М. Электрооптические свойства жидкокристаллических слоев со случайными планарными условиями на границах: Ph.D. thesis / Саратовский государственный университет им. НГ Чернышевского. — 2012.
247. Jacques S. L. Origins of tissue optical properties in the UVA, visible, and NIR regions // *OSA TOPS on Advances in Optical Imaging and Photon Migration*. — 1996. — Vol. 2. — Pp. 364–369.
248. The mechanical properties of rat tail tendon / B. J. Rigby, N. Hirai, J. D. Spikes, H. Eyring // *The Journal of general physiology*. — 1959. — Vol. 43, no. 2. — Pp. 265–283.
249. Reese S. P., Maas S. A., Weiss J. A. Micromechanical models of helical superstructures in ligament and tendon fibers predict large Poisson's ratios // *Journal of biomechanics*. — 2010. — Vol. 43, no. 7. — Pp. 1394–1400.
250. Effects of stretching on morphological and biochemical aspects of the extracellular matrix of the rat calcaneal tendon / F. M. de Almeida, T. C. Tomiosso, A. Biancalana et al. // *Cell and tissue research*. — 2010. — Vol. 342, no. 1. — Pp. 97–105.