

Трунина Наталья Андреевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ
ДЛЯ ИММЕРСИОННЫХ АГЕНТОВ И НАНОЧАСТИЦ МЕТОДАМИ
ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ И НЕЛИНЕЙНОЙ
МИКРОСКОПИИ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов 2016

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники физического факультета Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки РФ, доктор физико-математических наук, профессор Тучин Валерий Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН Богатырев Владимир Александрович

кандидат физико-математических наук
доцент кафедры общей физики и волновых процессов Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
Приезжев Александр Васильевич

Ведущая организация: ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»

Защита состоится 25 января 2016 в 13:30 на заседании диссертационного совета Д212.243.05 на базе Саратовского государственного университета по адресу 410012, Саратов, ул. Университетская, 83.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского», и на сайте СГУ по адресу:

http://www.sgu.ru/sites/default/files/dissertation/2015/10/27/dissertaciya_truninoy_1.pdf

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук,
профессор



В.Л. Дербов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение транспорта химических агентов в биологических тканях, в том числе в твердых тканях, является важной задачей по ряду причин. Первой из них является необходимость изучения метаболических процессов, осуществляемых посредством диффузии. Вторая причина связана с диагностикой биоткани оптическими методами, в частности, с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ). Основным препятствием для проникновения оптического излучения вглубь биологической ткани является рассеяние света на структурных элементах, показатель преломления которых отличается от показателя преломления базового вещества. Уменьшить рассеяние можно путем введения в биоткань химических агентов, выравнивающих указанные показатели преломления (метод оптического просветления).

Исследование проницаемости биотканей человека по отношению к различным агентам и лекарственным препаратам представляет интерес в широком контексте проблем, связанных с их лечением и косметологическим уходом. Одним из возможных методов изучения распространения химических агентов в биотканях является ОКТ.

Метод ОКТ в настоящее время является одним из наиболее перспективных и развивающихся методов неинвазивной диагностики оптически неоднородных сред. Основой метода является интерферометрическая регистрация низкокогерентного оптического излучения, отраженного от различных слоев биоткани. По сравнению с другими распространенными системами визуализации внутренней структуры объекта, такими как рентгеновская, магнитно-резонансная и ультразвуковая томография, ОКТ имеет преимущества по безопасности использования, стоимости оборудования, контрасту и разрешению получаемых изображений. Метод ОКТ исходно предназначен для визуализации, однако, обработка цифровых ОКТ-изображений позволяет извлечь количественные данные об оптических параметрах рассеивающей биоткани и ее морфологическом и функциональном состоянии. Такие исследования уже проводились, но для ограниченного числа биотканей (кровь, склера глаза, эпителий). Распространение данного подхода на более широкий круг биотканей, к которым относятся эмаль и дентин зуба, ткани ногтя и жировая ткань, является актуальной задачей.

Среди применений ОКТ в стоматологии преобладает визуализация структуры тканей зубов и полости рта *in vivo* для оценки их состояния по полученным изображениям. Мониторинг проникновения химических агентов в ткани зуба на основе математической обработки цифровых ОКТ изображений - новая и актуальная задача.

Проникновение в ткани зуба наночастиц - не менее важная проблема, чем транспорт химических агентов. С введением наночастиц в тубулы дентина связана разработка методов снижения гиперчувствительности зуба. Внедренные наночастицы могут оказывать бактерицидное действие, усиливать фотодинамическое воздействие, выполнять косметические функции, способствуя отбеливанию. В связи с этим актуальной задачей является развитие оптических методов для простого и неинвазивного контроля доставки наночастиц в ткань зуба. В качестве таковых представляет интерес использовать ОКТ и нелинейную микроскопию, также дающую послойное изображение, но с более высоким разрешением, достаточным для регистрации сигналов от отдельных наночастиц и их скоплений.

В силу доступности и особенностей строения ноготь пальца человека является удобным объектом ОКТ-визуализации *in vivo*. Как и в стоматологии, полученные изображения затем используются для дифференциальной диагностики заболеваний ногтя. Основное внимание разработчиков уделяется повышению контраста и разрешения изображений, а также скорости их получения. Актуальной задачей является применить ОКТ для изучения таких внешних воздействий на ткани ногтя *in vivo* (механическое сжатие, нанесение иммерсионного агента), которые могут вызывать оптическое просветление. Новые возможности можно ожидать от использования как видимых изменений самих ОКТ изображений, так и результатов их цифровой обработки в виде количественных оценок изменений геометрических и оптических параметров биотканей ногтя, что важно для мониторинга грибковых заболеваний ногтя и ряда системных заболеваний человека.

Действие оптического излучения, усиленное введением в биоткань красителя, в последнее время широко изучается в связи с целым рядом биомедицинских приложений, одно из которых – снижение количества жировых клеток, что представляет собой важную часть медицинских программ по борьбе с ожирением. Значительные размеры адипоцитов позволяют получать ОКТ изображения жировой ткани, на которых отдельные клетки хорошо видны, что открывает уникальную возможность использовать ОКТ для мониторинга последствий фотодинамического воздействия в

реальном времени на клеточном уровне. Такое применение ОКТ является актуальной задачей, а полученные ОКТ-изображения могут быть количественно обработаны с целью ответа на важный вопрос о том, что происходит с отдельными адипоцитами при фотодинамическом или ином воздействии.

Цель работы - изучить процессы доставки химических агентов и наночастиц в биоткани путем ОКТ-визуализации с цифровой обработкой изображений для количественного определения диффузионных и оптических свойств биотканей и их изменений под действием внешних факторов, а также с помощью нелинейной микроскопии. Основные объекты - образцы тканей зуба человека и жировой ткани *in vitro*, а также ткани ногтя пальца человека *in vivo*.

Задачи исследования:

- ОКТ-мониторинг проникновения вызывающих оптическое просветление химических агентов (вода, глицерин, глюкоза) в образцы *in vitro* дентина зуба человека и оценка коэффициентов проницаемости по скорости изменения среднего наклона А-скана.
- Оценка оптических параметров эпителиальных и фиброзных тканей под ногтем пальца человека *in vivo* и их изменений под действием просветляющего агента и механического сжатия с помощью цифровой обработки ОКТ изображений.
- ОКТ-мониторинг последствий фотодинамического воздействия на образцы жировой ткани *in vitro* в реальном времени на клеточном уровне
- Расчет проницаемости дентина по отношению к воде и перекиси водорода как функции размеров тубул и плотности их числа на основе простой модели тубулярной структуры.
- Разработка модели и численный расчет пространственно-временного поведения сигнала ОКТ при диффузии иммерсионного агента в макроскопически-неоднородной рассеивающей среде на основе численного решения уравнения диффузии с учетом зависимости сечения рассеяния назад от концентрации агента.
- Определение глубины проникновения наночастиц TiO_2 и ZnO в образцы дентина и эмали зуба человека методами ОКТ и нелинейной микроскопии.

Научная новизна работы:

- Методика оценки коэффициента проницаемости по скорости изменения среднего наклона сигнала ОКТ во времени впервые применена к

проникновению оптически просветляющих химических агентов (вода, глицерин, глюкоза) в образцы *in vitro* дентина зуба человека.

- Оценки коэффициентов ослабления света эпителиальными и фиброзными тканями под ногтем пальца человека *in vivo* впервые получены по результатам обработки ОКТ-изображений, продемонстрированы и оценены их изменения под действием просветляющего агента (глицерин) и механического сжатия.

- Впервые осуществлен ОКТ-мониторинг долговременных (десятки и сотни минут) последствий совместного воздействия света и красителя на образцы жировой ткани *in vitro* на клеточном уровне.

- С помощью простой модели тубулярной структуры дентина впервые рассчитаны зависимости коэффициентов проницаемости дентина по отношению к воде и перекиси водорода от диаметра и плотности числа тубул.

- На основе численного решения уравнения диффузии и известной теории формирования ОКТ сигнала в рассеивающей среде с заданными параметрами построена математическая модель эволюции ОКТ сигнала в процессе диффузии иммерсионного агента. В отличие от известных аналитических решений, модель применима к макроскопически неоднородным средам. Показано, что уменьшение сечения рассеяния назад при оптическом просветлении может приводить к немонотонному поведению сигнала ОКТ даже в макроскопически однородной среде.

- Впервые обнаружены заметные изменения формы усредненного сигнала ОКТ после длительной ультразвуковой обработки образца дентина зуба человека, погруженного во взвесь наночастиц TiO_2 . Определение глубины проникновения наночастиц TiO_2 и ZnO в образцы дентина и эмали зуба человека впервые выполнено методами нелинейной микроскопии.

Научная и практическая значимость работы.

- Доказана возможность использования серийного портативного оптического когерентного томографа THORLABS Spectral Radar OCT, исходно предназначенного для получения изображений биотканей *in vivo* в условиях медицинского учреждения, для решения фундаментальной биофизической задачи - мониторинга оптических, диффузионных и морфологических характеристик дентина и эмали зуба человека, тканей ногтя и жировой ткани в реальном времени при воздействии внешних факторов (апликация иммерсионного агента или взвеси наночастиц, механическое сжатие, фотодинамическое воздействие).

- Исследования диффузии просветляющих агентов в образцах дентина зуба человека подтвердили, что калибровка сигнала ОКТ, существенная для оценки коэффициента ослабления по его наклону, мало сказывается на характерном времени изменения указанного наклона и, следовательно, на оценке коэффициента проницаемости, которая является достаточно универсальной.
- Исследования тканей ногтя человека показывают, что с помощью ОКТ можно проводить не только визуализацию подобных биотканей *in vivo*, но и количественно определять относительные изменения оптических характеристик (коэффициента ослабления) под действием просветляющего агента или механического сжатия, что расширяет сферу практического (и в отдаленной перспективе, клинического) применения ОКТ.
- Выполненные автором диссертации ОКТ исследования образцов жировой ткани человека были использованы для получения дополнительной информации о механизмах фотодинамического воздействия на жировую ткань, что важно для медицинских исследований, направленных на борьбу с ожирением.
- Реализованная в виде численного алгоритма и программы модель формирования сигнала ОКТ в среде, испытывающей оптическое просветление в результате диффузии иммерсионного агента, применима к неоднородным средам и может быть полезна как для интерпретации будущих экспериментов, так и для использования в алгоритмах решения обратной задачи извлечения исходных оптических и диффузионных параметров среды из данных ОКТ-измерений.
- Помимо демонстрации возможностей оптического мониторинга проникновения наночастиц в образцы дентина и эмали зуба человека, практическая важность полученных в этом направлении результатов состоит в том, что они показывают весьма низкую эффективность «спонтанного» внедрения наночастиц в дентин и, тем более, эмаль зуба при погружении во взвесь наночастиц или при нанесении таковой на поверхность зуба и убеждают в необходимости поиска дополнительных мер интенсификации этого процесса.

На защиту выносятся следующие положения:

1. При исследовании плотных сильно рассеивающих биотканей (ткани зуба и ногтя человека) методика обработки цифровых ОКТ изображений, основанная на усреднении сигнала по группе А-сканов, позволяет лучше выявить как структурные элементы биоткани, так и сравнительно небольшие изменения сигнала ОКТ, вызванные внешними воздействиями (аппликация

иммерсионного агента, механическое давление) и слабо различимые визуально на исходном ОКТ изображении.

2. Методика обработки цифровых ОКТ-изображений с расчетом усредненного А-скана позволяет проводить мониторинг проникновения химических агентов в образцы тканей зуба человека по изменению среднего наклона сигнала ОКТ в реальном времени. Получаемые в результате постоянная времени насыщения и коэффициент проницаемости значительно менее чувствительны к калибровке сигнала, вкладу многократного рассеяния, а также наличию и характеру макроскопической неоднородности биоткани, чем сам наклон сигнала ОКТ и определяемый по нему коэффициент ослабления света биотканью.

3. Как показывает численное моделирование пространственно-временного поведения сигнала ОКТ в среде, где происходит диффузия иммерсионного агента, учет зависимости сечения рассеяния назад от концентрации агента существенно сказывается на пространственном поведении сигнала ОКТ и может приводить к появлению на А-скане максимума, который является индикатором указанного влияния.

4. Длительное (несколько суток) содержание срезов дентина и эмали зуба человека во взвеси наночастиц TiO_2 с периодическим (несколько раз в сутки) включением ультразвука приводит к заметным (до 5 дБ) изменениям формы усредненного А-скана ОКТ на глубинах, достигающих сотен микрометров. Эти данные свидетельствуют о проникновении наночастиц в образцы, но их недостаточно для оценки глубины проникновения, которая может быть завышена за счет многократного рассеяния. Прямая визуализация внедренных наночастиц методами нелинейной микроскопии показывает, что при небольших (до 30 минут) длительностях УЗ обработки срезов зуба человека, погруженных в суспензию наночастиц, глубина проникновения наночастиц ZnO в срезы дентина достигает десятков микрометров, а для наночастиц TiO_2 на порядок меньше, что можно объяснить большей степенью агрегации последних.

Достоверность результатов вытекает, прежде всего, из корректного использования современных и предварительно апробированных приборов и методик исследования (спектральный оптический когерентный томограф THORLABS Spectral Radar OCT (США); двухфотонный томограф JenLab GmbH (Германия) с титан-сапфировым фемтосекундным лазером Mai Tai XF, Spectra Physics (США), оптические и электронные микроскопы и др.). При

обработке результатов использовались пакеты прикладных программ, математические модели, и приближения, апробированные ранее другими авторами на родственных объектах. Там, где позволяли условия эксперимента, измерения проводились многократно с последующим статистическим усреднением. Результаты и выводы согласуются с современными представлениями о механизмах изученных процессов и опубликованными результатами других авторов, полученными с помощью альтернативных методов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на конференциях: Saratov Fall Meeting 2007 (SFM 2007), September, 25-28, 2007, Saratov, Russia; The International Topical Meeting on Optical Sensing and Artificial Vision 2008 (OSAV 2008), May, 12-15, 2008, St.-Petersburg, Russia; Biophotonics and Imaging Graduate Summer School (BIGSS'08), August, 29-September, 2, 2008, University of Limerick, Ireland; Scientific Meeting of EC-project "Photonics4Life", November, 18-19, 2008, Brussels, Belgium; SPIE Optics+Photonics 2009, August 1-6, 2009, San Diego, USA; Saratov Fall Meeting 2009 (SFM 2009), September, 21-24, 2009, Saratov, Russia; Scientific Meeting of EC-project "Photonics4Life", November, 6-18, 2009, Barcelona, Spain; SPIE Photonics West 2010, January, 23-28, 2010, San Francisco, USA; Научно-практическая конференция Presenting Academic Achievements to the World: 29-30 марта, 2010, Саратов, Россия; SPIE Photonics Europe 2010, April, 12-16, 2010, Brussels, Belgium; 71-я научно-практическая конференция студентов и молодых учёных Саратовского медицинского университета. «Молодые ученые – здравоохранению региона» МУ-ЗР'10: 22-24 апреля, 2010, Саратов, Россия; Saratov Fall Meeting 2010 (SFM 2010), October, 5-8, 2010, Saratov, Russia; SPIE Photonics West 2011, January, 22-27, 2011, San Francisco, USA; Saratov Fall Meeting 2011 (SFM 2011), September, 27-30, 2011, Saratov, Russia; SPIE Photonics West 2012, January, 21-26, 2012, San Francisco, USA; SPIE Photonics Europe 2012, April, 16-19, 2012, Brussels, Belgium; Russian-Chinese Workshop: Biophotonics and Biomedical Optics, SFM 2012, 26-28 September, 2012, Saratov, Russia; SFM 2012, 25-28 September, 2012, Saratov, Russia; 1st International Biophotonics Meeting in Israel, Conference BPI12, Tel Aviv, Israel, 9-11 December, 2012; SPIE Photonics West 2013, San Francisco, USA; February, 2-7, 2013.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 статей, из них 13 в рецензируемых изданиях, удовлетворяющих требованиям пунктов 12 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней» (входящих в SCOPUS и/или Перечень ВАК).

Личный вклад автора состоит в участии в постановке задач и планировании работ совместно с руководителем проф. Тучиным В.В., в проведении экспериментов и обработке их данных, в проведении расчетов, в написании статей и презентации результатов на конференциях. Исследования по двухфотонной микроскопии проникновения наночастиц в ткани зуба проводились совместно с М.Е. Дарвиным в Центре экспериментальной и прикладной кожной физиологии Медицинского университета «Шарите», Берлин, Германия под руководством профессора Ю. Ладеманна. Исследования жировой ткани проводились совместно с И.Ю. Яниной, которая использовала результаты ОКТ-исследований автора диссертации для дальнейшей статистической обработки и интерпретации.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, основной части, содержащей 6 разделов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 317 наименований, содержит 45 рисунков и 3 таблицы. Объем диссертации составляет 157 страниц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении (раздел 1)** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризованы новизна полученных результатов, их достоверность, научная и практическая значимость, публикация и апробация, личный вклад соискателя, структура и объем работы.

Обзорные разделы 2 и 3 имеют целью ввести читателя в современное состояние проблемы и определить основные понятия и термины. В **разделе 2**, посвященном методам исследования, приведены сведения об оптической когерентной томографии (ОКТ) и нелинейной микроскопии, использующей генерацию второй гармоники и флуоресценцию с двухфотонным возбуждением. В **разделе 3** описаны диффузия химических агентов в биотканях и эффект оптического просветления за счет иммерсии. Далее приводятся сведения о строении зуба и обзор работ по использованию ОКТ для изучения его тканей. Описаны строение ногтя пальца человека и применение ОКТ для его исследования, а также строение жировой ткани и проблема разрушения адипоцитов.

В **разделе 4** излагаются результаты экспериментальных исследований автора диссертации по ОКТ-мониторингу проникновения иммерсионных агентов в образцы зубной ткани *in vitro*. Зубы, удаленные в ходе плановых операций, хранились в физиологическом растворе в темноте, распиливались алмазным диском на пластинки толщиной около 1 мм, поверхности которых шлифовались, промывались ортофосфорной кислотой и помещались

ультразвуковую ванну на 10 мин. для очистки. В выбранных образцах тубулы дентина были примерно перпендикулярны поверхности спила. С помощью микроскопа (Axio Imager, Carl Zeiss, увеличение 32) можно было увидеть входы в дентинные каналы, оценить размеры и плотность распределения тубул по поверхности спила и выбрать области для ОКТ исследования. Для ОКТ зондирования оставлялось окно 2 мм×2 мм при аппликации агента со стороны зондирования, либо два окна на противоположных гранях при аппликации с тыльной стороны. Остальная поверхность покрывалась прозрачным изолирующим лаком с целью по возможности исключить проникновение агента с разных сторон образца. Перед измерениями образцы высушивались в воздушном потоке

Томографические изображения образцов получались с помощью системы THORLABS Spectral Radar OCT - промышленного прибора, предназначенного для медико-биологических исследований, в том числе *in vivo*, имеющего компактное настольное исполнение и снабженного подвижной зондирующей головкой, которая при проведении количественных измерений *in vitro* закреплялась на штативе. Схема прибора показана на рис. 1.

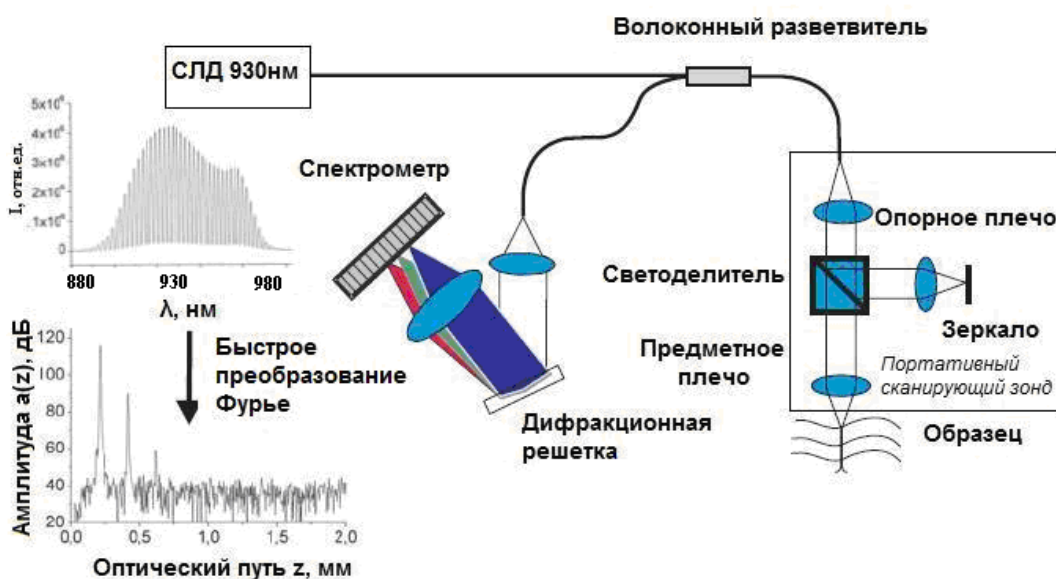


Рис. 1. Схема установки THORLABS Spectral Radar OCT.

Широкополосное излучение от суперлюминесцентного диода с центральной длиной волны 930 ± 5 нм, выходной мощностью 2 мВт и шириной спектральной полосы 100 ± 5 нм направляется в портативный зонд с интерферометром Майкельсона, который делит свет на два отдельных пучка. Опорное плечо заканчивается зеркалом, а другое плечо содержит линзу, которая фокусирует свет на образец. Эта же линза используется для того, чтобы собрать

рассеянный в направлении назад или отраженный от образца свет. Пучки из обоих плеч интерферометра совмещаются и направляются в спектрометр с разрешением по длине волны 0,14 нм, который пространственно разделяет свет различных частот. Формируемая таким образом интерференционная картина затем анализируется для получения спектрального ОКТ изображения. Аксиальное разрешение системы в свободном пространстве составляет 6,2 мкм. Управление процессом измерения, сбор, хранение и обработка данных осуществлялись через компьютер с помощью специального пакета программного обеспечения. Изображение записывалось и хранилось в виде двумерного массива, имевшего 512 строк (по глубине) и около 2000 столбцов (по ширине) и отображалось на экране компьютера. Максимальная скорость съемки 8 кадров в секунду, максимальные размеры изображаемой области 1,6 мм по глубине и 6 мм по ширине. Для подавления шумовой составляющей ОКТ сигнала проводилось усреднение по группе соседних столбцов матрицы изображения (А-сканов). Для этого визуально выбирался участок ОКТ изображения, однородный в латеральном направлении (рис. 2).

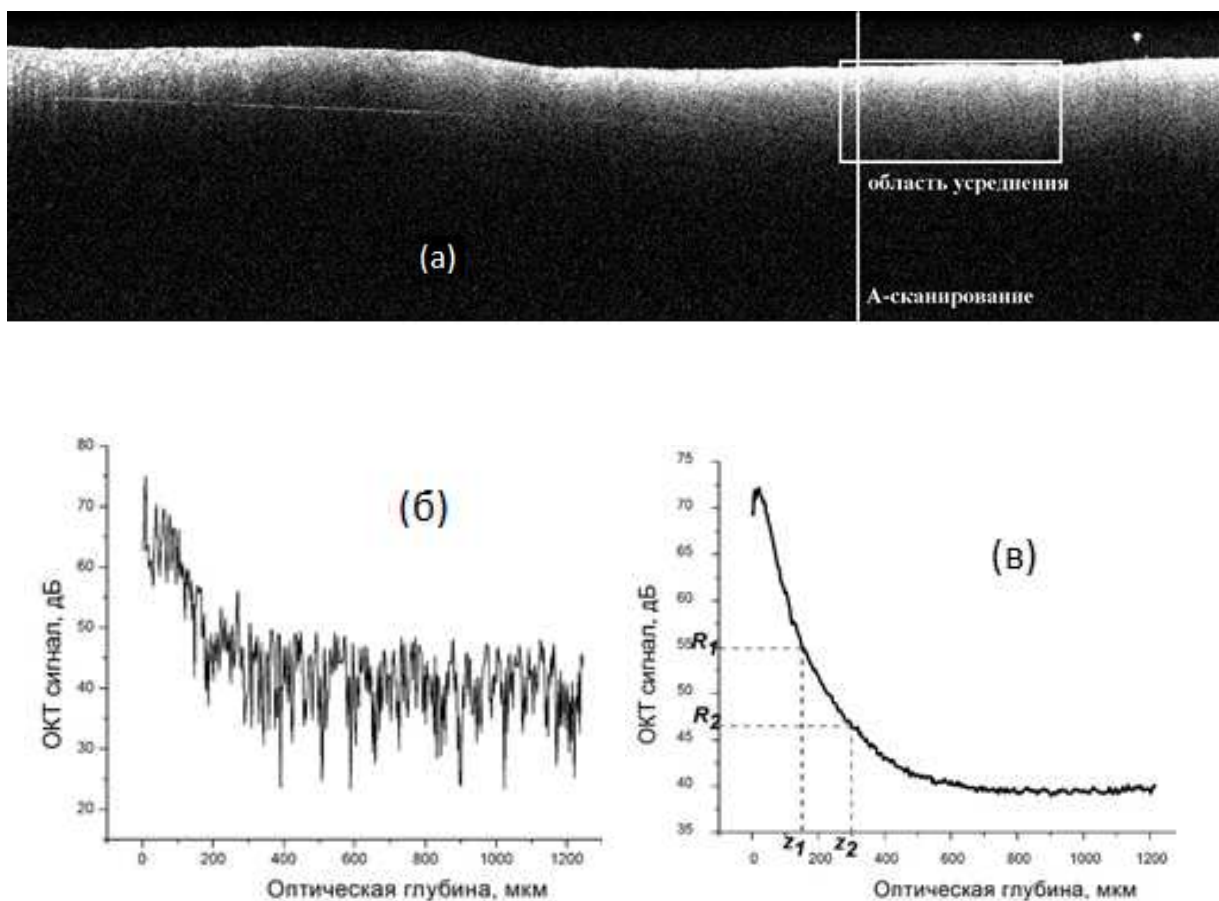


Рис. 2. Пример ОКТ-изображения среза дентина; показаны положение выбранного А-скана и области усреднения (а). Вид единичного (б) и усредненного (в) А-скана

Для усредненного А-скана по двум значениям оптической глубины z_1 и z_2 вычислялся средний наклон сигнала ОКТ (СНС ОКТ)

$$\frac{R(z_2) - R(z_1)}{\Delta z} = \frac{1}{2\Delta z} \ln \frac{\sigma_b(z_2)}{\sigma_b(z_1)} - \frac{1}{\Delta z} \int_{z_1}^{z_2} \mu_t(z') dz' = \frac{1}{2\Delta z} \ln \frac{\sigma_b(z_2)}{\sigma_b(z_1)} - \bar{\mu}_t, \quad (1)$$

где $R(z) = \ln[I(z)]$ - сигнал ОКТ логарифмическом масштабе, $\Delta z = z_2 - z_1$, $\sigma_b(z)$ - сечение рассеяния назад на глубине z , $\bar{\mu}_t$ - средний коэффициент ослабления в слое Δz . Выражение (1) следует из общей теории формирования сигнала ОКТ [Thrane L., et al., JOSA 17, 484 (2000)] в приближении однократного рассеяния с учетом макроскопической неоднородности образца. Если мало различие $\sigma_b(z)$ на глубинах z_2 и z_1 и/или достаточно велико Δz , то СНС ОКТ (1) позволяет определить средний коэффициент ослабления $\bar{\mu}_t$, что ранее делалось для других биотканей (см. [Tuchin V.V. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, 3rd edition. Bellingham WA: SPIE Press, 2015]). Проникновение просветляющего агента уменьшает коэффициент ослабления, и СНС ОКТ меняется со временем (рис. 3,а). Зависимость СНС ОКТ от времени аппроксимировалась затухающей экспонентой (рис. 3, б), постоянная времени которой τ использовалась для оценки *коэффициента проницаемости* биоткани по формуле $P = \Delta z / \tau$. Заметим, что, в отличие от $\bar{\mu}_t$, величина τ мало зависит от калибровки прибора и вклада макроскопических неоднородностей. Применялись две схемы аппликации агента: со стороны ОКТ-зондирования и с тыльной стороны. Несмотря на визуальные различия во временных изменениях А-сканов, оба способа давали близкие значения τ .

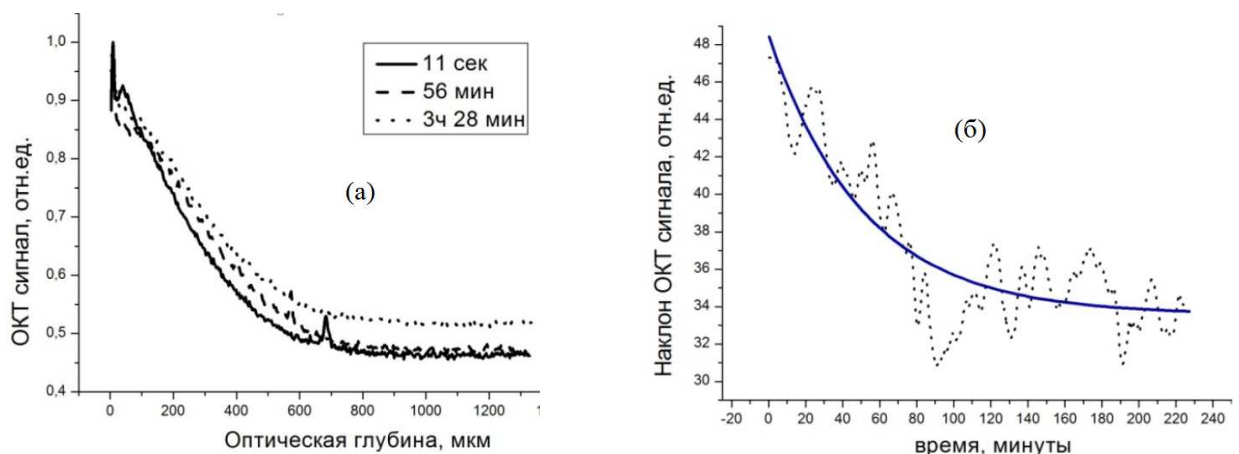


Рис. 3. Усредненные А-сканы в различные моменты времени (а) и временная зависимость СНС ОКТ (пунктир) аппроксимированная экспонентой (сплошная линия) (б). Образец № 1, агент - вода. Интервал глубин 150-300 мкм.

В Табл. 1. приведены результаты определения коэффициентов проницаемости по описанной схеме В качестве агентов, вызывающих оптическое просветление, использовалась вода и 44% водный раствор глицерина. Из таблицы видно, что разброс значений коэффициента проницаемости достигает порядка величины за счет значительных вариаций тубулярной структуры от образца к образцу.

Таблица 1. Характеристики проникновения воды и глицерина в образцы дентина (по данным микроскопии и ОКТ-мониторинга)

№ образца	Толщина образца, мм	Средний диаметр тубул, мкм	Агент	Постоянная времени, мин	Коэффициент проницаемости, см/с
1	0.9	0.6±0.1	вода	78	$(3.0±0.1) \times 10^{-6}$
2	1.3	2.3±0.1	вода	9	$(4.0±0.2) \times 10^{-5}$
3	1.2	1.6±0.1	вода	154	$(2.1±0.6) \times 10^{-6}$
4	0.8	2.4±0.5	44% глицерин	54	$(1.5±2.2) \times 10^{-5}$

По той же методике исследовалось длительное (5 суток) воздействие водного раствора глюкозы (33%) на проницаемость образцов дентина по отношению к воде (рис. 4).

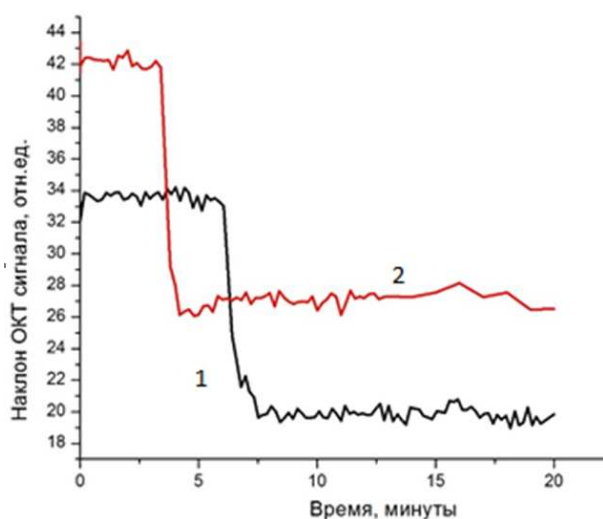
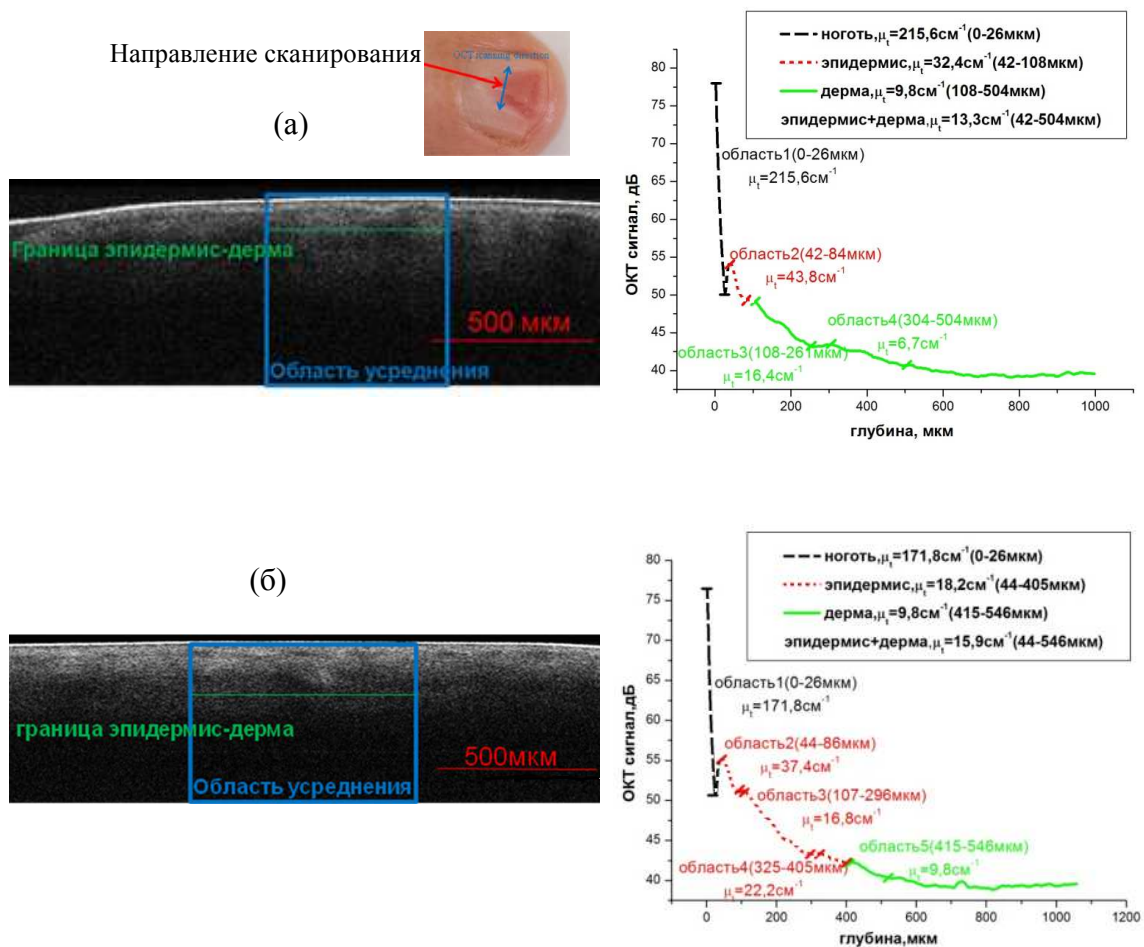


Рис. 4. Временные зависимости среднего наклона ОКТ сигнала при смачивании образца дистиллированной водой до (1) и после (2) пяти суток содержания в 35% водном растворе глюкозы. Интервал глубин 60-240 мкм.

Эксперимент можно рассматривать как попытку имитации условий, характерных для зубной ткани *in vivo* при нарушениях сахарного обмена. Аппроксимация $y(t) = y_0 + Ae^{-(t-t_0)/\tau}$ кривых рис. 4 дала для τ значение $(0.72±0.45)$ мин до воздействия глюкозы и $(0.48±0.04)$ мин. после него (уменьшение в 1.5

раза). Задержка начала спада СНС ОКТ (горизонтальный сдвиг кривой на рис. 4) уменьшается в 1.9 раза, а коэффициент проницаемости дентина для воды растет от $(2,6 \pm 1,6) \times 10^{-4}$ см/с до $(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-4}$ см/с. Для выяснения механизма действия глюкозы нужны дополнительные данные, но можно предположить, что увеличение проницаемости срезов дентина по отношению к воде связано с уплотнением тубулярного дентина и увеличением объема свободного пространства внутри тубул.

Раздел 5 начинается с описания ОКТ визуализации тканей ногтя пальца человека, для которого недостаточно исследованным остается воздействие химического агента в сочетании с механическим давлением на систему эпителиальных и фиброзных тканей. Верхний слой ногтя мужчины-добровольца 66 лет был частично удален с помощью алмазной пилочки. ОКТ-сканирование производилось в нескольких участках обработанного таким образом ногтя при касании пластикового ограничителя оптического зонда, при надавливании ограничителя на ноготь и после 20 минутного воздействия глицерина на поверхность ногтя (рис. 5).



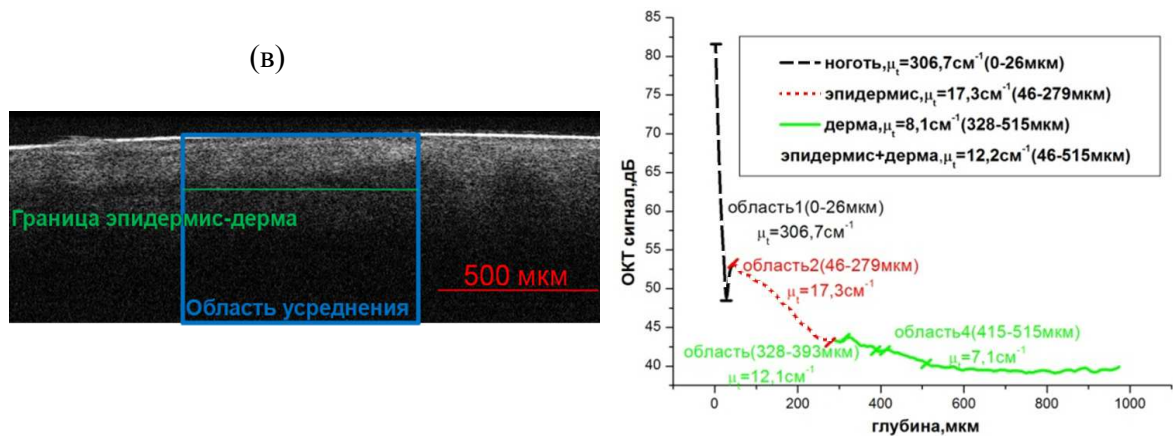


Рис. 5. ОКТ-изображения (слева) и усредненные А-сканы (справа) одного из участков ногтя в отсутствие внешних воздействий (а), при надавливании (б) и при после аппликации глицерина (в).

Оценки $\bar{\mu}_t$ в ногтевой пластинке, эпидермисе и дерме сделаны в предположении, что средний наклон сигнала ОКТ в каждом слое обусловлен только ослаблением сигнала без учета возможных изменений сечения рассеяния назад. Однако, даже если точность определения абсолютных значений $\bar{\mu}_t$ таким способом может вызывать сомнения, из наблюдаемых относительных изменений $\bar{\mu}_t$ в слоях уже можно сделать некоторые выводы. Измерения на разных участках ногтя показали, что толщина эпидермиса и дермы под ногтевой пластинкой сильно зависит от расстояния до ее края. Более детальное рассмотрение позволяет предположить, что ноготь в глицерине утолщается и набухает, а далее отдает его в кожу, где эпидермис с дермой хорошо просветляются. При нажатии ситуация иная: размягченный за счет удаления верхнего твердого слоя ноготь легко поддается компрессии, так же реагирует эпидермис, но реакции дермы не видно. Значит, выдавливания крови нет или его просто не видно на длине волны 930 нм. Данный эксперимент показал, что усредненные А-сканы более информативны, чем сами ОКТ-изображения. На них лучше видны слои тканей, а по изменению наклона участков можно судить об относительных изменениях рассеивающих свойств слоев при компрессии и аппликации просветляющего агента.

Вторая часть **раздела 5** посвящена ОКТ-мониторингу процессов в образцах жировой ткани *in vitro* после окрашивания индоцианиновым зеленым (ИЗ) или бриллиантовым зеленым (БЗ) и/или фотовоздействия диодного лазера (LS-2-N-808-10000, $\lambda=808$ нм, 5 мин.) или диодной лампы (Ultra Lume Led 5, $\lambda=442$ и 597 нм, 15 мин.). Значительные размеры адипоцитов позволили впервые визуализировать отдаленные последствия фотодинамического воздействия на клеточном уровне с применением промышленного томографа THORLABS Spectral Radar OCT (рис. 6).

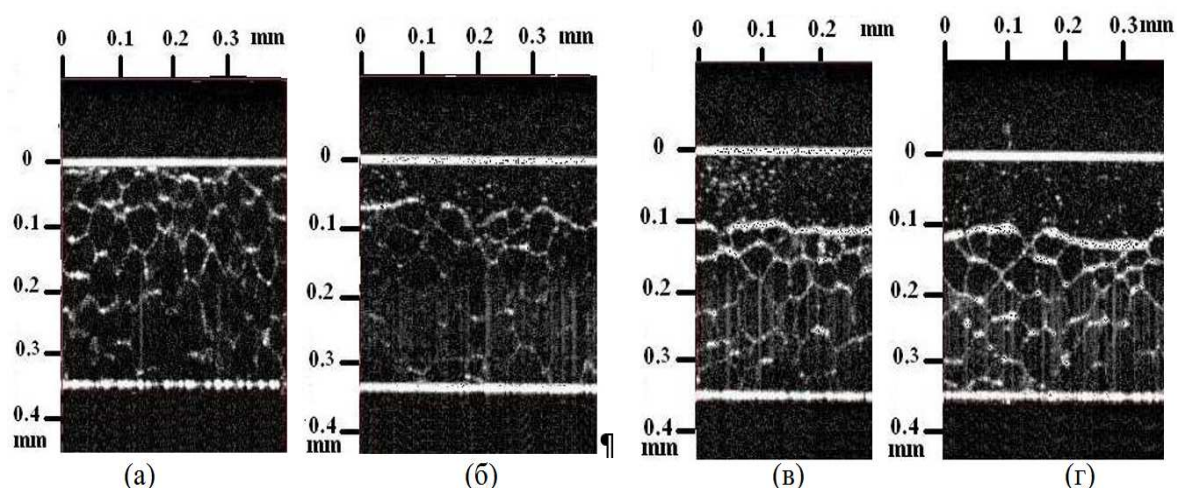


Рис. 6. Пример ОКТ-изображений срезов жировой ткани, окрашенных БЗ, до облучения диодной лампой (а); через 15 минут после облучения (б); через 60 мин. (в); через 120 минут (г). Температура образца 37°C.

Дальнейший анализ, выполненный соавторами по результатам нашей ОКТ-визуализации, показал, что со временем распределения адипоцитов по размерам становится более однородным, так как число мелких клеток увеличивается в результате липолиза, а число крупных клеток - в результате набухания и слияния жировых капель. Временной масштаб изменений клеток после окрашивания и экспозиции (60—300 мин.), определенный по результатам ОКТ-мониторинга, согласуется с временами описанного в литературе биологического отклика. Наиболее значительные изменения видны в приповерхностном слое (80–90 мкм в примере, показанном на рис. 6). Изменения ОКТ изображений были интерпретированы как результат липолиза и разрушения клеток, спровоцированного фотодинамическим воздействием. Продукты липолиза (глицерин и вода) вызывают оптическое просветление образца, проявлявшееся в увеличении отраженного сигнала от его нижней границы. При физиологической температуре (37°C) инициированные фотодинамическим воздействием морфологические изменения жировой ткани проявлялись на ОКТ-изображении быстрее и были значительнее, чем при комнатной (25°C).

В разделе 6 рассмотрены две математические модели. Первая из них представляет тубулярную структуру образца дентина в виде плоского слоя интертубулярного (*i*) дентина, пронизанного заполненными тубулярным (*t*) дентином полыми цилиндрами из более плотного перитубулярного (*p*) дентина. По известным коэффициентам диффузии D этих трех компонентов оценивался коэффициент проницаемости дентина как функция диаметра и плотности числа тубул для воды и перекиси водорода (рис. 7).

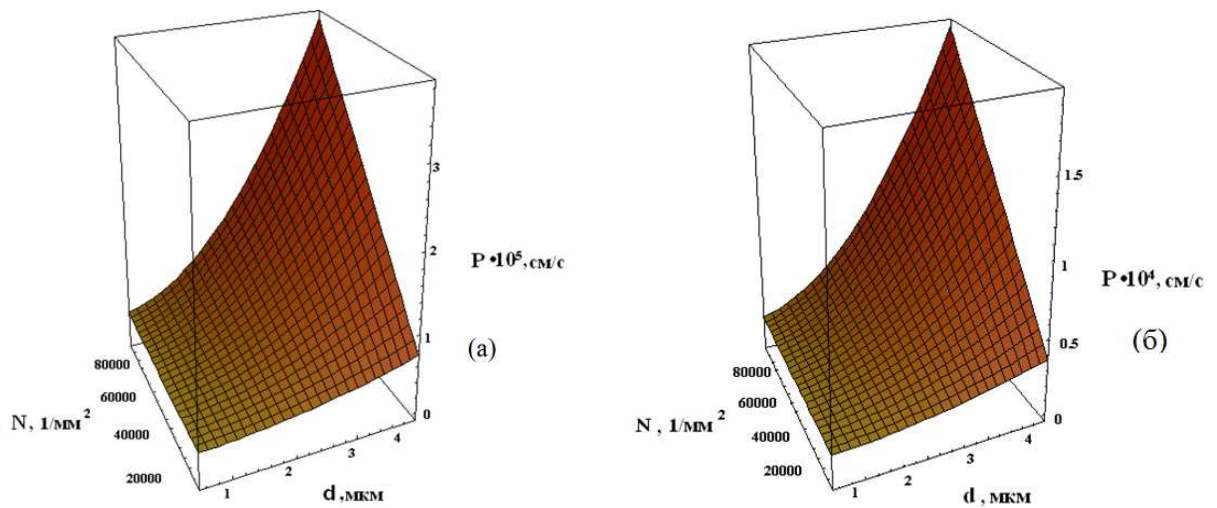


Рис. 7. Проницаемость P слоя дентина в зависимости от диаметра тубул d и плотности их числа N для перекиси водорода ($D_i = 3,6 \times 10^{-7}$ см²/с, $D_t = 3,6 \times 10^{-6}$ см²/с, $D_p = 3,6 \times 10^{-8}$ см²/с) (а) и воды ($D_i = 1,74 \times 10^{-6}$ см²/с, $D_t = 1,74 \times 10^{-5}$ см²/с, $D_p = 1,74 \times 10^{-7}$ см²/с) (б). Толщина слоя 1 мм.

Вторая модель описывает процесс формирования сигнала ОКТ в процессе оптического просветления рассеивающей среды за счет диффузии иммерсионного агента в базовом веществе, окружающем рассеивающие частицы. Она основана на численном решении одномерного уравнения диффузии с последующим пересчетом изменения концентрации агента в изменение показателя преломления базового вещества, а затем в изменение коэффициента рассеяния, который в слабо поглощающей среде дает доминирующий вклад в μ_t . Далее используется теория формирования сигнала ОКТ [Thrane L., et al., JOSA 17, 484 (2000)] в среде с заданным распределением коэффициента ослабления μ_t и сечения рассеяния назад σ_b , порождающего полезный сигнал. Если исходная среда макроскопически однородна, такое распределение отражает меняющуюся концентрацию иммерсионного агента. В качестве применения разработанной модели, реализованной в виде программы в среде пакета “Mathematica”, мы исследовали эволюцию сигнала ОКТ при условиях, когда из-за оптического просветления меняется не только μ_t , но и σ_b . Заметим, что до этого мы следовали общепринятой методике обработки сигнала ОКТ, в которой изменение σ_b не учитывается, и было важно выяснить, к каким качественно новым эффектам оно может приводить. Использовалась феноменологическое выражение $\sigma_b(C(z,t)) = \sigma_{b0} + k\sigma_s(C(z,t))$, где $C(z,t)$ - концентрация агента, σ_s - сечение рассеяния, отвечающее за ослабление сигнала, σ_{b0} - часть сечения диффузного отражения, связанная с другими механизмами и не зависящая от концентрации агента. Рисунок 8 (а)

демонстрирует качественное согласие с экспериментом в поведении А-сканов в ходе диффузии, а рис. 8 (б) показывает, что частичное просветление σ_b может приводить к появлению на А-скане максимума, сглаживающегося и пропадающего по мере диффузии агента.

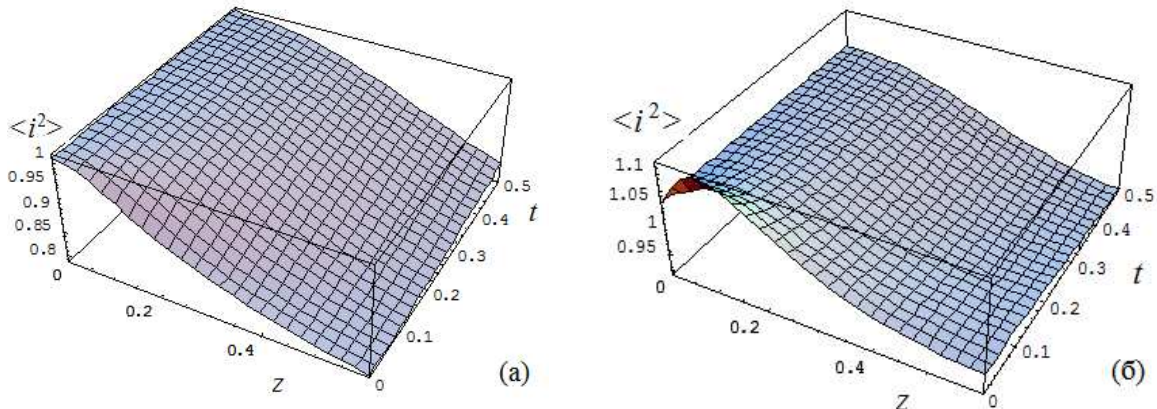


Рис. 8. Эволюция А-скана (зависимости сигнала ОКТ $\langle i^2 \rangle$ от координаты z) во времени t без учета зависимости σ_b от концентрации иммерсионного агента, $\sigma_{b0} = 1, k = 0$ (а) и с учетом таковой, $\sigma_{b0} = 1, k = 0,25$ (б). Все величины выражены в безразмерных относительных единицах.

Такие А-сканы наблюдалось нами в некоторых экспериментах (см. рис. 2 (в)), однако для вычисления СНС ОКТ всегда использовалась спадающая часть. Заметим, что в отличие от известных аналитических решений одномерного уравнения диффузии, наша модель применима к неоднородным средам с произвольно заданным пространственным распределением коэффициента диффузии и оптических свойств.

Раздел 7 посвящен оптическому мониторингу проникновения наночастиц в образцы тканей зуба. Вначале мы использовали ОКТ. Образцы дентина и эмали, подготовленные как в разделе 4, обрабатывались суспензией частиц TiO_2 (размер <100 нм, Aldrich, USA) с концентрацией 10 мг/мл в Poly(Sodium4-Styrene-Sulfonate), предварительно помещавшейся 15 мин. в УЗ ванну (43–45 кГц) для предотвращения седиментации. Образцы погружались в кювету с суспензией TiO_2 , а кювета снова помещалась в УЗ ванну на 15 минут для стимуляции проникновения наночастиц в толщу зубной ткани. Затем поверхность образца промывалась водой и просушивалась в воздушном потоке в течение 30 минут для удаления остатков взвеси с поверхности образца. После этого производилось его ОКТ-сканирование. Подобная процедура повторялась несколько раз, после чего образцы снова помещались

в кювету с суспензией TiO_2 и оставлялись в ней до следующего дня. Полная продолжительность эксперимента с одним образцом составляла 10 дней.

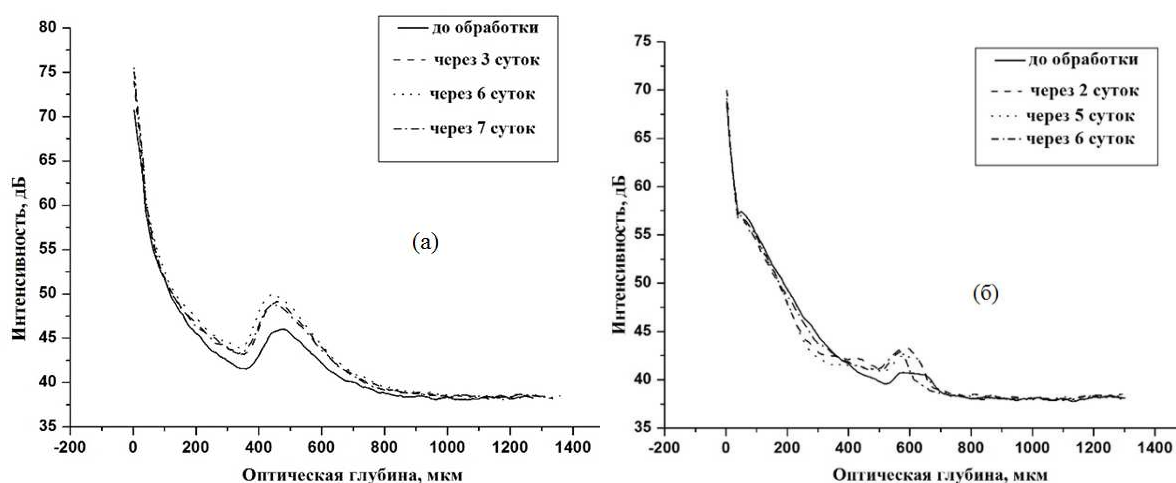


Рис. 9. Усредненные А-сканы, полученные в различные моменты времени в процессе обработки дентина (а) и эмали (б) взвесью наночастиц TiO_2 . Максимум в центре - структурный дефект образца, не связанный с проникновением наночастиц.

Рисунок 9 показывает, что в результате нескольких суток выдерживания среза зуба, содержащего эмаль и дентин, во взвеси наночастиц TiO_2 с ежедневно повторяемой обработкой ультразвуком возникают заметные (до 5 дБ) изменения ОКТ сигнала, указывающие на усиление рассеяния с глубины порядка сотен микрометров. Эти изменения можно связать с проникновением наночастиц в образец, однако, точная оценка глубины проникновения затруднительна, так как проникшие в приповерхностный слой частицы могут значительно усилить многократное рассеяние. Задержка возвращающихся фотонов на ОКТ изображении выглядит как увеличение глубины. Для непосредственной визуализации наночастиц разрешения ОКТ недостаточно. Поэтому эксперименты были продолжены с использованием нелинейной микроскопии на основе эффектов генерации второй гармоники (ГВГ) и флуоресценции, возбуждаемой двухфотонным поглощением (ФВДП).

Эксперименты проводились в Центре экспериментальной и прикладной кожной физиологии Медицинского университета «Шарите», Берлин, Германия под руководством профессора Ю. Ладеманна. Использовался двухфотонный томограф (JenLab GmbH, Германия) с компактным перестраиваемым титан-сапфировым фемтосекундным лазером ближнего ИК диапазона (Mai Tai XF, Spectra Physics, США), модулем сканирования пучка с гальваносканерами и пьезопроводной оптикой, приемным модулем с

быстродействующим фотоумножителем (ФЭУ), а также управляющим блоком, включающим программный пакет JenLab и служащим для построения изображений. Лазер имел длительность импульса 100 фс, частоту следования импульсов 80 МГц, максимальную выходную мощность вблизи образца 50 мВт, диапазон доступных длин волн 710–920 нм. Высокая числовая апертура ($NA=1,3$) объектива с пьезоприводом (Zeiss EC Plan-Neofluar 40x/1.3 oil) обеспечивала высокое пространственное разрешение, достигающее 0,5 мкм в латеральном и 2 мкм в аксиальном направлении. Типичный размер поля сканирования 200 мкм × 200 мкм, время сканирования составляло 13,4 с.

Исследовались наночастицы TiO_2 (анатаз) и ZnO (Sigma-Aldrich, Германия). По данным сканирующей электронной микроскопии средние размеры исходных частиц в порошке 30 нм для TiO_2 и 310 нм для ZnO . Частицы ZnO генерируют когерентное (ГВГ) и некогерентное (гиперрэлеевское рассеяние (ГРР)) излучение на удвоенной частоте возбуждающего света в дополнение ФВДП, в то время как частицы TiO_2 генерируют только ФВДП. Сигналы ФВДП и ГВГ/ГРР одновременно регистрировались в двух каналах быстродействующими ФЭУ с чувствительностью на уровне единичных фотонов, их разделение осуществлялось расположенными перед ФЭУ оптическими фильтрами (400–700 нм для ФВДП и 380 ± 5 нм для ГВГ/ГРР).

Образцы ткани зуба обрабатывались суспензией наночастиц TiO_2 и ZnO , для приготовления которых 24 мг наночастиц смешивались с 1 мл 0.8% 3-карбокситетраметилпирролидин-1-оксида (Sigma-Aldrich, Германия). В течение 15 минут образцы, погруженные в суспензию, обрабатывались в ультразвуковой ванне Bandelin SONOREX SUPER RK 102 H, 35 кГц, 240 Вт для разрушения агрегатов и стимуляции проникновения частиц в образец. После УЗ обработки образцы споласкивались водой и записывались сканы нелинейной оптической микроскопии (см. пример на рис. 10), затем образцы снова помещались в кювету с суспензией наночастиц и обрабатывались ультразвуком в течение 15 минут. Вся процедура повторялась 3 раза. Для повышения контраста слабый собственный фон ткани подавлялся снижением интенсивности лазера. Максимальная наблюдаемая глубина проникновения составила 45 мкм для наночастиц ZnO и 5 мкм для TiO_2 . Такую разницу можно объяснить различием размера агрегатов, который у ZnO значительно меньше, а также возможным различием чувствительности обнаружения для различных наночастиц. Рассматривая сложный процесс проникновения наночастиц в пористую ткань зуба по аналогии с диффузией, можно грубо оценить нижнюю границу соответствующего «коэффициента диффузии» D по глубине d и

времени τ проникновения как $D \cong d^2/\tau$. Для наночастиц ZnO это дает $D \cong 2.5 \times 10^{-8}$ см²/с в дентине и $D \cong 10^{-9}$ см²/с в эмали, для TiO₂ $D \cong 2.8 \times 10^{-10}$ см²/с в дентине, а в эмали получить изображения не удалось из-за сильной фоновой засветки.

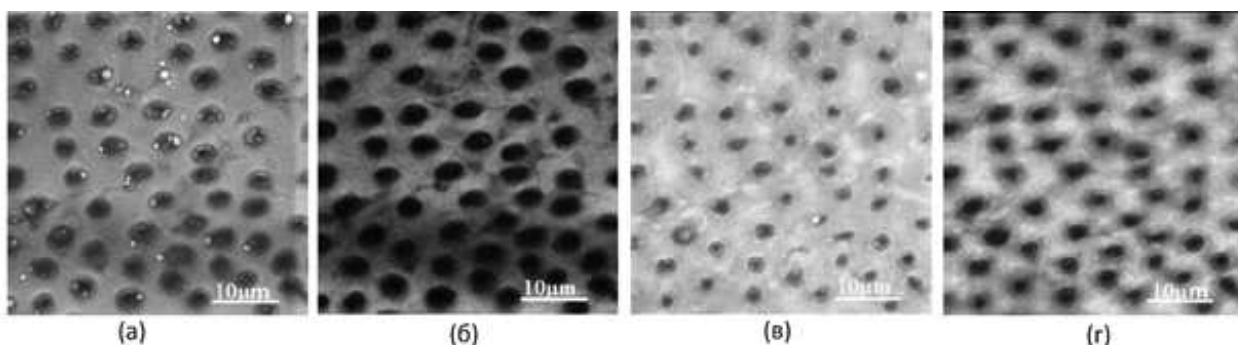


Рис. 10. Изображения дентина, полученные с помощью ФВДП (а, в) и ГВГ/ГРР (б, д) после 30 минут ультразвуковой обработки в суспензии TiO₂ на глубине $z = 0$ мкм (а, б) и $z = 5$ мкм (в, г). На фоне хорошо разрешаемой тубулярной структуры наночастицы или их скопления видны как яркие белые точки.

Основные результаты работы.

- С помощью ОКТ-мониторинга исследовано проникновение вызывающих оптическое просветление химических агентов (вода, глицерин, глюкоза) в образцы *in vitro* дентина зуба человека и оценены коэффициенты проницаемости по скорости изменения среднего наклона А-скана. После длительного воздействия раствора глюкозы обнаружено увеличение коэффициента проницаемости образцов дентина для воды.
- С помощью цифровой обработки ОКТ изображений проведена оценка оптических параметров эпителиальных и фиброзных тканей под ногтем пальца человека *in vivo* и их изменений под действием просветляющего агента глицерина и механического сжатия.
- С помощью ОКТ-мониторинга в реальном времени на клеточном уровне выявлены изменения структуры образцов жировой ткани *in vitro* после фотодинамического воздействия.
- На основе трехкомпонентной модели тубулярной структуры по известным значениям коэффициента диффузии компонентов рассчитан коэффициент проницаемости дентина по отношению к воде и перекиси водорода как функция размеров тубул и плотности их числа.
- Разработана модель эволюции сигнала ОКТ при диффузии иммерсионного агента в рассеивающей среде на основе численного решения уравнения диффузии. Путем численного моделирования показано, что зависимость сечения рассеяния назад от концентрации агента может приводить

появлению максимума на А-скане. В отличие от известных аналитических решений, модель применима и к неоднородным средам.

- Обнаружены изменения сигнала ОКТ в образцах дентина после длительной обработки суспензией наночастиц TiO_2 с применением ультразвука. Методами нелинейной микроскопии определены глубины проникновения наночастиц TiO_2 и ZnO в образцы дентина и эмали зуба человека.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Trunina N.A., Derbov V.L., Tuchin V.V., Altshuler G.B. Dentinal permeation modeling // Proc. SPIE. 2008. V. 6791. P. 67910T-1-7. (Scopus)
2. Trunina N.A., Lychagov V.V., Tuchin V.V. OCT monitoring of clearing agents within tooth dentin // Proc. SPIE. 2009. V. 7443. P. 74432D-1-8. (Scopus)
3. Trunina N.A., Lychagov V.V., Tuchin V.V. OCT monitoring of diffusion of water and glycerol through tooth dentin in different geometry of wetting // Proc. SPIE. 2010. V. 7563. P. 7563OU-1-5. (Scopus)
4. Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Lychagov V.V., Portnov S.A., Trunina N.A., Miller D.R., Cho S., Oh H., Shim B., Kim M., Oh J., Eum H., Ku Y., Kim D., Yang Y. Finger tissue model and blood perfused skin tissue phantom // Proc. SPIE. 2011. V. 7898. P. 78980Z-1-11. (Scopus)
5. Larin K.V., Ghosn M.G., Bashkatov A.N., Genina E.A., Trunina N.A., Tuchin V.V. Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion // IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 2011. V. 18. No. 3. P. 1244 - 1259. (Scopus)
6. Yanina I.Yu., Trunina N.A., Tuchin V.V. Temporal change of adipose tissue refractive index at photodynamic treatment: in vitro study using OCT // Proc. SPIE. 2012. V. 8222. P. 82221G-1-6. (Scopus)
7. Trunina N.A., Popov A.P., Lademann J., Tuchin V.V., Myllylä R., Darvin M.E. Two-photon-excited autofluorescence and second-harmonic generation microscopy for the visualization of penetration of TiO_2 and ZnO nanoparticles into human tooth tissue *ex vivo* // Proc. SPIE. 2012. V. 8427. P. 8427OY-1-6. (Scopus)
8. Yanina I.Yu., Trunina N.A., Tuchin V.V. Optical coherence tomography of adipose tissue at photodynamic/photothermal treatment *in vitro* // J. Innovat. Opt. Health Sci. 2013. V. 6. No. 2. P. 1350010-1-7. (Scopus)
9. Yanina I.Yu., Trunina N.A., Tuchin V.V. Photo-induced cell morphology alterations quantified within adipose tissues by spectral OCT // J. Biomed. Opt. 2013. V. 18. No. 11. P. 111407-1-10. (Scopus)
10. Trunina N.A., Darvin M.E., Kordás K., Sarkar A., Mikkola J.-P., J. Lademann, Meinke M.C., Myllylä R., Tuchin V.V., Popov A.P. Monitoring of TiO_2 and ZnO nanoparticle penetration into enamel and dentine of human tooth *in vitro* and as-

assessment of their photocatalytic ability // IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 2014. V. 20. No. 3. P. 7300108-1-8. (Scopus)

11. Trunina N.A., Derbov V.L., Tuchin V.V. Simple numerical model of OCT signal evolution due to the diffusion of an optical clearing agent // Proc. SPIE. 2014. V. 9031. P. 90310B-1-9. (Scopus)

12. Трунина Н.А., Лычагов В.В., Тучин В.В. Исследование диффузии воды через дентин зуба человека методом оптической когерентной томографии // Опт. и спектр. 2010. Т. 109., № 2. С. 190-196. (Scopus, ВАК)

13. Трунина Н.А. Тучин В.В. Визуализация проникновения наночастиц TiO_2 в ткани зуба человека методом оптической когерентной томографии // Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Физика. 2011. Т. 11. №. 2, С. 5-9. (ВАК)

14. Кальянов А.Л., Лычагов В.В., Трунина Н.А., Федосов И.В., Лагодина Н.А., Тучин В.В., Беликов А.В., Альтшулер Г.Б. Исследование возможности химического отбеливания зубов, используя отверстия в эмали // Проблемы оптической физики (Материалы 11-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофотонике, 25– 28 сентября 2007) Саратов: Новый ветер, 2008. С.44 - 47.

15. Трунина Н.А., Дербов В.Л., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б. Модель проницаемости дентина // Проблемы оптической физики и биофотоники (Материалы 12-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофотонике, 23 – 26 сентября 2008). Саратов: Новый ветер, 2009. С. 42 - 47.

16. Герасимова Н.С., Трунина Н.А., Генина Э.А., Башкатов А.Н., Кочубей В.И., Тучин В.В. Исследование оптического просветления дентина // Проблемы оптической физики и биофотоники (Материалы 12-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофотонике 23 – 26 сентября 2008). Саратов: Новый ветер, 2009. С. 47 - 54.

Подписано к печати 10.11.2015 года. Формат 60×48 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать цифровая.
Усл. печ. л. ____ . Тираж 100 экз. Заказ № ____ .

Отпечатано в типографии СГУ
Саратов, Большая Казачья 112-а
Тел. (8452)27-33-85