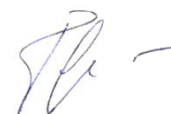


На правах рукописи



Генина Элина Алексеевна

**УПРАВЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ**

03.01.02 — Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Саратов – 2017

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского»

Научный консультант: **Тучин Валерий Викторович**, доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Захаров Валерий Павлович**, доктор физико-математических наук, профессор, зав. кафедрой лазерных и биотехнических систем ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»

Каменский Владислав Антониевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук»

Мареев Глеб Олегович, доктор медицинских наук, доцент ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России»

Ведущая организация: ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «22» ноября 2017 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.243.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», по адресу 410012, Саратов, ул. Университетская, д. 40, корпус III, аудитория 34.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте <http://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-05/doktorskaya-dissertaciya-geninoy-eliny-alekseevny>.

Автореферат размещен на сайте ВАК.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук,
профессор



Симоненко Георгий Валентинович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Проблема управления оптическими параметрами биологических тканей включает в себя широкий спектр вопросов, связанных с воздействием экзогенных препаратов, таких как иммерсионные жидкости, красители, микро- и нанообъекты, на биологические ткани, с целью кратко- или долговременного изменения их рассеивающих и поглощающих свойств. Эта проблема возникла на волне развития оптических методов для клинической функциональной визуализации, диагностики и терапии рака и других заболеваний. Такой интерес обусловлен уникальной информативностью, относительной простотой, безопасностью и достаточно низкой стоимостью оптических устройств по сравнению, например, с рентгеновской компьютерной томографией или магниторезонансной томографией.

Однако основным ограничением оптических методов диагностики и терапии, включающих оптическую диффузионную томографию, оптическую когерентную томографию, конфокальную микроскопию, отражательную спектроскопию, фототермическую и фотодинамическую терапию и пр., является сильное рассеяние света в биологических тканях и крови, которое является причиной снижения контраста и пространственного разрешения, а также малой глубины зондирования [1].

Одним из самых простых и эффективных методов решения проблемы увеличения глубины зондирования, повышения качества изображений внутритканевых структур и достоверности спектроскопической информации от глубоких слоёв биотканей и крови, является временное и обратимое снижение светорассеяния в биотканях [2, 3].

В настоящее время развитие флуоресцентной диагностики, фотодинамической и фототермической терапии, а также наиболее современного направления – тераностики, подразумевающей использование препаратов, позволяющих осуществлять как диагностическую визуализацию, так и терапевтическое воздействие, требует изучения взаимодействия соответствующих фотосенсибилизаторов с биологическими тканями, направленного на повышение их поглощательной способности в определённом спектральном диапазоне. С этой точки зрения перспективными сенсбилизаторами для фотодинамической, фототермической терапии и тераностики являются биосовместимые, не обладающие существенной темновой токсичностью красители, такие как метиленовый синий (МС) и индоцианиновый зелёный (ИЗ). Необходимость исследования взаимодействия МС и ИЗ с биологическими тканями и жидкостями очевидна, поскольку, во-первых, их флуоресцентные свойства и фотодинамическая активность зависят от формы, в которой находятся красители, а, во-вторых, эффективность их использования, как в диагностических, так и в терапевтических и хирургических приложениях, требует совпадения длины волны источников излучения с максимумом поглощения красителей [4-6]. Впервые транспорт МС в патологически изменённой слизистой

оболочке и коже и ИЗ в коже и волосяных фолликулах исследован в работах [7, 8].

Одной из важнейших проблем данной области науки является преодоление рогового слоя эпидермиса, являющегося естественным барьером организма, при местном нанесении оптических просветляющих агентов, фотосенсибилизаторов и частиц. Для решения данной проблемы предлагается целый ряд подходов, включающих использование химических усилителей (энхансеров) проницаемости эпидермиса, методов физических или мультимодальных воздействий. Основное внимание исследователей направлено на разработку неинвазивных и малоинвазивных методов увеличения проницаемости эпидермиса, обеспечивающих достаточно эффективную доставку препаратов в более глубокие дермальные слои кожи. Создание искусственных каналов в коже с помощью микропорации даёт более глубокую местную доставку как лекарственных препаратов, так и разного рода частиц [9, 10]. Однако использование фракционной лазерной микроабляции для повышения проницаемости эпидермиса для микро- и наночастиц является достаточно новым направлением исследований, в котором существует ряд нерешённых проблем, связанных, в основном, с доставкой частиц-контейнеров в глубокие слои дермы, созданием в коже депо лекарственных препаратов и обеспечением управляемого высвобождения содержащего носителей, что может быть реализовано только при помещении носителей в дерму. Об актуальности данного направления исследований свидетельствуют обзоры, публикуемые в ведущих научных журналах [11, 12].

Целью работы является установление механизмов управления рассеивающими и поглощающими свойствами биологических тканей с помощью экзогенных препаратов и разработка на их основе методов управления данными свойствами.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**:

1. Исследование особенностей и механизмов воздействия оптических иммерсионных агентов на биоткани (склера глаза, твёрдая мозговая оболочка, кожа, костная и мышечная ткани) *ex vivo* и *in vitro* для определения наиболее эффективных с точки зрения повышения прозрачности биотканей.
2. Исследование механизмов воздействия гиперосмотических иммерсионных агентов на склеру и кожу *in vivo* при поверхностном и инъекционном введении.
3. Изучение влияния различных химических и физических энхансеров, а также мультимодального воздействия, направленных на повышение скорости и глубины проникновения иммерсионных оптических агентов через естественный эпидермальный барьер.
4. Исследование проницаемости эпидермиса *in vivo* при его фракционной оптотермической и лазерной микроабляции для оптических иммерсионных агентов и частиц, разработка на основе фракционной микроабляции эпидермиса мультимодальных методов доставки препаратов в дерму, и создание в дерме депо лекарственных препаратов при использовании в качестве носителей нано- и микрочастиц.

5. Исследование влияния снижения рассеяния биоткани, окружающей неоднородность, а также повышения рассеяния самой неоднородности, на контраст оптических методов визуализации тканевых неоднородностей, в частности оптической когерентной томографии.
6. Исследование взаимодействия поглощающих агентов (растворов метиленового синего и индоцианинового зелёного) с биотканями (слизистой оболочкой и кожей) *ex vivo* и *in vitro* при использовании различных растворителей, позволяющих повысить как скорость их проникновения, так и контраст их визуализации за счёт снижения рассеяния в области взаимодействия, и оценка эффективного коэффициента диффузии данных красителей в биотканях.
7. Исследование влияния повышения поглощающих свойств кожи на эффективность антибактериальной фотодинамической/фототермической терапии.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

Основные научные положения:

1. Механизм оптического просветления соединительных биологических тканей под действием гиперосмотических иммерсионных агентов включает три основных процесса, идущих с различными скоростями: 1) наиболее быстрый процесс дегидратации ткани, 2) более медленный, чем первый, процесс замещения воды во внутритканевой жидкости иммерсионным агентом и 3) наиболее медленный процесс набухания ткани. Первые два процесса приводят к согласованию показателей преломления компонентов биоткани (оптическому просветлению), третий – к некоторому снижению оптической прозрачности биоткани.
2. Существует оптимальное время воздействия иммерсионной жидкости на биоткань, при котором достигается максимально возможная степень оптического просветления.
3. Различия эффектов, сопровождающих оптическое просветление ткани, зависят от способа введения иммерсионного гиперосмотического агента в ткани *in vivo*: при поверхностном нанесении агента степень оптического просветления ткани постепенно возрастает, гемостаза в области воздействия не наблюдается; при инъекционном введении кинетика степени оптического просветления носит более сложный характер, в области инъекции наблюдается локальный гемостаз.
4. Увеличение скорости оптического просветления кожи под действием гиперосмотических иммерсионных агентов при использовании фракционной микроабляции эпидермиса связано с возрастанием скорости дегидратации, при этом скорость проникновения иммерсионных агентов внутрь кожи в зонах абляции увеличивается незначительно.
5. Внутривенное введение золотых наночастиц способствует увеличению контраста ОКТ-изображения и оптической глубины детектирования кровеносных сосудов, а также неоднородностей в ткани печени в период их накопления в органе.

6. Распространение индоцианинового зелёного в коже при использовании в качестве растворителей растворов многоатомных спиртов (глицерина и пропиленгликоля) сопровождается агрегацией красителя вследствие взаимодействия с внутритканевой жидкостью биоткани. При использовании водных растворов этанола агрегации красителя не происходит, скорость проникновения красителей через роговой слой эпидермиса значительно увеличивается.

Основные результаты работы:

1. Разработана методика увеличения проницаемости эпидермиса *in vivo* для иммерсионных агентов с помощью комбинации физико-химического воздействия (низкочастотный ультразвук и раствор диметилсульфоксида), способствующей достижению степени оптического просветления интактной кожи, сравнимой со степенью оптического просветления кожи в отсутствие рогового слоя эпидермиса.
2. Разработана методика создания депо лекарственных препаратов в коже *in vivo* с помощью фракционной лазерной микроабляции кожи при использовании в качестве носителей микро- и наночастиц.

Научная новизна

1. Раскрыты гидратационные/дегидратационные и иммерсионные механизмы оптического просветления ряда тканей *ex vivo* и *in vitro* под действием гиперосмотических иммерсионных агентов.
2. Впервые установлено существование оптимального времени воздействия иммерсионной жидкости на биоткань, при котором достигается максимально возможная степень оптического просветления.
3. Раскрыты механизмы воздействия гиперосмотических иммерсионных агентов при их введении различными способами (поверхностном и инъекционном) на оптические свойства ряда соединительных тканей *in vivo*.
4. Впервые представлены результаты исследования взаимодействия патологически изменённой слизистой оболочки гайморовой пазухи человека *in vitro* и фотосенсибилизатора метиленового синего.
5. Впервые представлены результаты изучения взаимодействия кожи *in vitro* и фотосенсибилизаторов метиленового синего и индоцианинового зелёного при использовании в качестве растворителей химических энхансеров проницаемости и многокомпонентных гиперосмотических растворов.
6. Впервые представлены результаты исследования влияния этанола на проницаемость эпидермиса для фотосенсибилизаторов метиленового синего и индоцианинового зелёного.
7. Впервые представлены результаты изучения изменения рассеивающих свойств кожи при микроабляции эпидермиса.

8. Представлены результаты исследования повышения контраста изображений в оптической когерентной томографии печени при внутривенном введении золотых наночастиц.
9. Предложены и разработаны методики фракционной оптотермической микроабляции (ФОТМА) для доставки лекарственных препаратов в кожу.
10. Предложены и разработаны методики фракционной лазерной микроабляции (ФЛМА) для доставки разномасштабных частиц в кожу.
11. Предложена и разработана мультимодальная методика усиления транспорта гиперосмотических иммерсионных агентов и наночастиц в коже *in vivo*.
12. Разработана методика фототерапии и фототермолиза воспалительных бактериальных заболеваний кожи (акне) с помощью их фотосенсибилизации индоцианиновым зелёным и облучения светом в спектральном диапазоне 803-809 нм;
13. Разработана методика фототерапии воспалительных бактериальных заболеваний слизистых оболочек полости рта (гингивит) с помощью их фотосенсибилизации метиленовым синим и облучения светом с длиной волны 663 нм.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе представлены новые фундаментальные знания о механизмах воздействия гиперосмотических иммерсионных жидкостей и фотосенсибилизаторов на соединительные ткани (склеру, твёрдую мозговую оболочку, дерму, костную ткань), мышечную ткань, эпидермис и слизистую оболочку. Получены новые фундаментальные данные о скорости проникновения метиленового синего и индоцианинового зелёного соответственно в слизистую оболочку и кожу. Автором предложен подход к решению проблемы увеличения скорости проникновения фотосенсибилизаторов через роговой слой эпидермиса. Автором разработана методика внедрения микро- и наночастиц в глубокие слои кожи за счёт создания в дерме микроканалов с помощью фракционной абляции. Совокупность результатов, полученных в результате проведённых исследований, можно квалифицировать как решение крупной научной задачи – разработки методов управления оптическими параметрами биологических тканей за счёт временного изменения их рассеивающих и поглощающих свойств путём введения экзогенных препаратов, включающих биосовместимые иммерсионные жидкости, красители и частицы.

Полученные результаты способствовали развитию нового научного направления, состоящего в использовании оптического просветления биотканей для повышения эффективности многих современных оптических методов биомедицинских исследований: отражательной спектроскопии, оптической когерентной томографии, оптической эмиссионной томографии, нелинейной микроскопии, ультрамикроскопии и многих других.

Проведённые эксперименты и клинические испытания предложенных методик окрашивания биотканей индоцианиновым зелёным и последующего фотовоздействия

показали, что полученные результаты могут быть использованы в клинической практике лечения воспалительных заболеваний слизистых оболочек полостей носа и рта, кожного акне и других заболеваний [13, 14].

Разработанная методика внедрения нано- и микрочастиц, а также микроконтейнеров, заполненных лекарственными препаратами, в кожу и создания в ней депо, может способствовать развитию нового направления управляемого терапевтического воздействия микродозами лекарственных препаратов при лечении заболеваний, требующих курсового воздействия.

О востребованности результатов исследований свидетельствуют высокая цитируемость работ автора диссертации в целом (более 1200 цитат на июнь 2017 г. для основных публикаций), а также цитирование в ведущих научных журналах и монографиях, например [12, 15-18].

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствие с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований: № 06-02-16740_a, «Фундаментальные исследования и приложения метода иммерсионного оптического просветления биологических тканей и крови» (2006-2008), РФФИ-КНР № 08-02-92224_a «Физические и физиологические механизмы оптического просветления», (2009-2010), РФФИ-Белоруссия № 10-02-90039-Bel_a, "Influence of structural and morphological features of tissues on their optical properties and light fields in the near-UV - NIR spectral range," (2010-2011), РФФИ-Королевское общество Великобритании 12-02-92610-RS_a, «Лазерная трансфекция клеток и тканей, меченных золотыми наночастицами» (2012-2013), РФФИ-КНР № 13-02-91176_a «Механизмы оптического просветления кожи в норме и патологии, количественная оценка» (2013-2014); Российского Научного Фонда № 14-15-00186 «Прецизионная метрология пространственно-временных оптических и тепловых процессов, индуцированных импульсным лазерным облучением биологических тканей и клеток, допированных наночастицами» (2014-2016); Американского Фонда Гражданских Исследований и Развития № SA-006-07 [REC-006] Post-Doctoral Fellowship Award (2003), № RUB1-570-SA-04 «Designing of the optical system and technology for skin acne phototherapy and monitoring of optical and physiological properties of pre/post treated skin» (2005-2008), № RUB1-2932-SR-08 «Noninvasive assessment of topical drug delivery in ocular tissues» (2009-2011); Европейского Союза № ICT-2007.3.5 FP-7 NETWORK OF EXCELLENCE: Photonics4Life, Network of Excellence for Biophotonics (2008-2012); Президента РФ №№ НШ-25.2003.2 (2003-2005), НШ-208.2008.2 (2008-2010), НШ-703.2014.2 (2014-2015), НШ-7898.2016.2 (2016-2017); государственными контрактами № 02.740.11.0484 «Исследование терапевтических, токсических и термических воздействий комплексов наночастица-фотосенсибилизатор при лазерном воздействии» (2009-2011), № 02.740.11.0770 «Разработка оптических методов исследования и мониторинга изменений параметров биологических тканей и цельной

крови при изменении содержания глюкозы в тканях организма человека и животных» (2010-2012), № 02.740.11.0879 «Разработка новых фотонных технологий анализа биофизических процессов в живых организмах на субклеточном, клеточном и тканевом уровнях для задач неинвазивной и минимально-инвазивной диагностики и терапии» (2010-2012), № 14.В37.21.0728 «Развитие физических основ и приложений высокоразрешающей томографической и поляризационной микроскопии для субмикронного анализа объемной структуры объектов технического и биологического происхождения» (2012-2013), № 11.519.11.2035 «Разработка компьютерного диагностического комплекса для выявления ранних патологических изменений в кровотоке мозга» (2012-2013); Правительства РФ № 14.Z50.31.0004 «Дистанционно управляемые наноструктурированные системы для адресной доставки и диагностики» (2014-2016).

Достоверность представленных научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их соответствием результатам, полученным другими авторами. Основные результаты работы опубликованы в российских и международных научных журналах.

Апробация работы

Основные результаты, изложенные в диссертации, докладывались на международных конференциях: SPIE Photonics West (BIOS) 1999-2009, 2011, 2013 (USA); Saratov Fall Meeting (SFM) 1998-2016 (Saratov, Russia); International Conference on Biomedical Optics (BMO), 1999 (China); European Biomedical Optics Week (EBiOS) 2000, 2001 (Germany); European Workshop "BioPhotonics 2002", 2002 (Iraklion, Greece); Conference on Laser Optics 2003, 2008 (S.-Petersburg, Russia); Optics and Photonics, 2004 (Glasgow, UK); Biophotonics: From Fundamental Principles to Health, Environment, Security and Defense Applications, 2004 (Ottawa, Canada); European Conferences on Biomedical Optics (ECBO), 2005 (Munich, Germany); Annual Meeting of the American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS), 2006, 2007, 2010, 2012 (Kissimmee, Florida, USA); International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT) 2003 (UK), 2005 (China), 2007 (Finland), 2008 (Hungary), 2011 (Bulgaria), 2014 (France), 2015 (Portugal); Annual International Laser Physics Workshop (LPYS) 2004 (Italy), 2005 (Japan), 2006 (Switzerland), 2007 (Mexico), 2009 (Spain); International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (LAT), 2005 (Russia), 2007 (Belarus), 2010, 2013 (Russia); International Symposium: Topical Problems of Biophotonics (TBP), 2007, 2015 (N.-Novgorod, Russia); International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (PIBM), 2009, 2010 (Wuhan, China); Photonics Asia 2012, 2012 (Beijing, China); 4th International Conference on Smart Materials, Structures and Systems of CIMTEC -2012, 2012 (Montecatini Terme, Italy); 3rd International Congress on Biophotonics (ICOB-2012), 2012 (Jena, Germany); 1st International Biophotonics Meeting in Israel, 2012 (Tel-Aviv, Israel); IV съезд Биофизиков России, 2012 (Н.-Новгород, Россия); Russian-Chinese Workshop, 2012 (Saratov, Russia); 3rd International Conference

on BioPhotonics, 2015 (Florence, Italy); 7-th Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium PALS'15, 2015 (Saratov, Russia).

Личный вклад

Большая часть экспериментальных результатов была получена лично соискателем, а также совместно с коллегами научных групп в рамках сотрудничества при выполнении совместных проектов. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследований, получении экспериментальных результатов, обработке и анализе данных и публикации результатов, представленных в диссертации. Программы оценки эффективного коэффициента диффузии красителей в биотканях и коэффициента ослабления разработаны доцентом кафедры оптики и биофотоники канд. физ.-мат. наук А.Н. Башкатовым. Экспериментальные исследования и обсуждение результатов проводились на кафедре оптики и биофотоники Саратовского научно-исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского совместно с д.ф.-м.н., проф. В.А. Тучиным, д.ф.-м.н. проф. В.И. Кочубеем, д.ф.-м.н. проф. Ю.П. Синичкиным, д.ф.-м.н., проф. Г.В. Симоненко, к.ф.-м.н. Ю.И. Свенской, Л.Е. Долотовым. Клинические исследования проводились совместно с врачами Саратовского государственного университета им. Разумовского д.м.н., проф. Т.Г. Каменских, д.м.н., проф. О.В. Мареевым, к.м.н., доц. А.В. Князевым, к.м.н. В.А. Титоренко, к.м.н. Е.Е. Чикиной, к.м.н. В.Н. Шерстнёвой и врачом О.Д. Одоевской. Эксперименты с животными проводились совместно с д.б.н. Г.С. Терентюком и к.б.н. А.Б. Бучарской. Гистологическая подготовка и анализ образцов проводились на кафедре патологической анатомии Саратовского государственного университета им. Разумовского (д.м.н., проф. Г.Н. Маслякова, асп. Н.А. Наволокин). Светодиодные зубные щётки разработаны и сконструированы в Лазерном центре Санкт-Петербургского государственного университета информационных технологий, механики и оптики (проф. А.В. Беликов) в сотрудничестве с Palomar Medical Technologies Inc (Burlington, MA, США) (проф. Г.Б. Альтшулер и к.ф.-м.н. И.В. Ярославский). Золотые наночастицы были предоставлены лабораторией нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (д.ф.-м.н., проф. Н.Г. Хлебцов, д.ф.-м.н. Б.Н. Хлебцов), микроконтейнеры были предоставлены лабораторией «Дистанционно управляемые системы для тераностики» ОНИ НС и БС СГУ (д.х.н., доц. Д.А. Горин).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 55 научных работ, в том числе 37 научных статей, включённых в перечень рекомендованных ВАК, и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, 14 статей в сборниках трудов конференций, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, и 4 главы в монографиях.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, шести глав, заключения,

списка использованных источников (986 наименований) и пяти приложений. Общий объём, включая 251 страницу основного текста с 110 рисунками и 14 таблицами, список использованных источников на 77 страницах и приложения на 60 страницах, составляет 388 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована её цель и основные задачи, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены основные положения и результаты, выносимые на защиту, апробация работы и личный вклад автора, описаны структура и объём диссертации.

В **Главе 1** приведен аналитический обзор литературы, посвящённый описанию поглощающих и рассеивающих характеристик биологических тканей и методам управления ими. В главе представлены также физико-химические основы иммерсионного метода управления рассеивающими свойствами биологических тканей, свойства многофункциональных агентов, используемых в тераностике, результаты исследования токсичности агентов, используемых для оптического иммерсионного просветления биотканей, и некоторых фотодинамических/фототермических агентов и частиц. Рассмотрены методы доставки агентов для оптического просветления и тераностики и улучшения проницаемости биологических тканей для этих агентов.

Глава 2 посвящена исследованию механизмов изменения рассеивающих свойств биоткани с помощью иммерсионного метода. Особенности диффузии гиперосмотических иммерсионных жидкостей исследовались в соединительной ткани (склера глаза и твёрдая мозговая оболочка человека, черепная кость свиньи), коже крысы и человека и мышечной ткани быка *in vitro* и *ex vivo*. Часть исследований проводилась на склере и коже экспериментальных животных *in vivo*. В качестве оптических просветляющих агентов (ОПА) использовались растворы глюкозы, и многоатомные спирты (глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоли). Все эти агенты обладают показателями преломления выше, чем показатель преломления внутритканевой жидкости (1.33-1.36 в видимом и ближнем ИК спектральном диапазоне [1]).

Измерения коэффициентов коллимированного пропускания и диффузного отражения биоткани выполнялись с помощью оптического многоканального спектрометра ЛЭСА-бмед (БиоСпек, Россия) в спектральном диапазоне 400-800 нм и многоканального спектрометра USB4000 (Ocean Optics Inc., США) в спектральном диапазоне 400-1000 нм.

Для нескольких образцов склеры, твёрдой мозговой оболочки и кожи человека проводились измерения зависимости веса от времени воздействия ОПА. Рассчитывались степень дегидратации (или набухания) биоткани:

$$H_D(t) = A_D(1 - \exp(-t/\tau_D)), \quad (1)$$

где H_D - степень дегидратации (набухания) биоткани; A_D - максимальная степень дегидратации (набухания), а τ_D – постоянная времени дегидратации (набухания), которая характеризует скорость процесса.

Для мониторинга распространения ОПА в коже и оценки коэффициента ослабления зондирующего света использовалась оптическая когерентная томография (ОКТ), которая проводилась с помощью спектрального оптического когерентного томографа OCP930SR 022 (Thorlabs Inc, США). Источником излучения служил суперлюминесцентный диод с рабочей длиной волны 930 ± 5 нм и шириной полосы на полувысоте пика излучения 100 ± 5 нм.

Коэффициент ослабления света на участке биоткани μ_t , представляющий собой сумму коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , может быть получен методом подбора параметров аппроксимирующей кривой, рассчитанной с помощью модели однократного рассеяния, на интересующем участке в области наклона А-скана ОКТ-сигнала [19]:

$$R(z) = A \exp(-\mu_t z) + B, \quad (2)$$

где A – коэффициент пропорциональности равный $P_0 \alpha(z)$; P_0 – оптическая мощность в пучке, падающем на поверхность биоткани; $\alpha(z)$ - отражательная способность биоткани на заданной глубине, определяемая локальным показателем преломления и локальной способностью биоткани рассеивать свет назад; B – фоновый сигнал.

Клинические испытания с участием человека соответствовали международным стандартам проведения процедур «Надлежащая клиническая практика» (ICH Topic N6: Good Clinical Practice).

Организация работы с животными соответствовала международным этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с законом о благополучии животных Конвенции Европейского Союза и Европейской Конвенции защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), международными правилами Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies от 04.03.2002 г. и приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» [20].

На рисунке 1 представлены типичные спектральные и временные зависимости коллимированного пропускания образцов твёрдой мозговой оболочки (ТМО) под действием раствора глюкозы с концентрацией 3М (0.54 мг/мл, показатель преломления 1.398 на длине волны 589 нм).

Полученные результаты позволяют утверждать, что процесс просветления под действием иммерсионных агентов протекает в две стадии, что обусловлено двумя процессами, идущими с разной скоростью: 1) оптической иммерсией – т.е. согласованием показателей преломления рассеивателей ткани (в основном коллагеновых волокон) и внутритканевой жидкости, за счёт чего происходит

снижение светорассеяния; 2) набуханием биоткани – т.е. увеличением объёма образца за счёт расширения пространства между волокнами при замещении молекул воды гидратной оболочки коллагена молекулами ОПА (и соответственным уменьшением объёмной доли рассеивателей в измеряемом объёме биоткани), вследствие чего рассеяние ткани увеличивается.

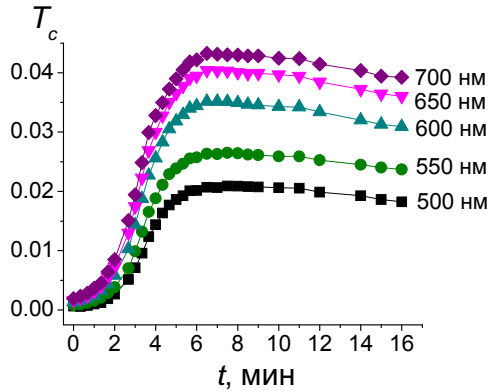


Рисунок 1 - Типичные временные зависимости коллимированного пропускания образца ТМО под действием водного 3М раствора глюкозы.

Уточнение механизма оптического просветления биоткани под действием рН-нейтральных иммерсионных агентов высокой концентрации проводилось с помощью измерений веса образцов кожи. Кинетика изменения веса образцов кожи под действием 88%-раствора глицерина и пропиленгликоля по сравнению с дегидратацией на воздухе за счёт испарения внутритканевой воды представлена на рисунке 2. Роговой слой эпидермиса (РСЭ) подвергался фракционной оптотермической микроабляции (ФОТМА) с помощью системы широкополосной лампы-вспышки и маски-аппликатора, представляющей собой углеродные точки на прозрачной подложке. С помощью такой системы на поверхности кожи создавались участки микроабляции.

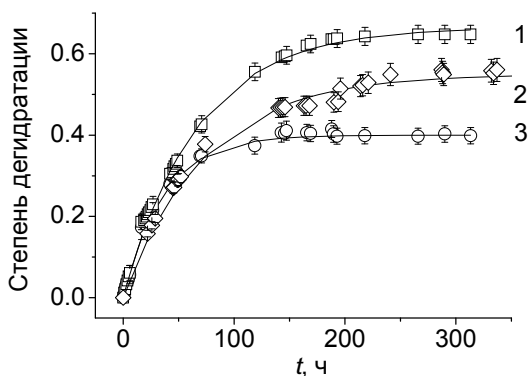


Рисунок 2 – Кинетика степени дегидратации образцов кожи человека с перфорированным роговым слоем эпидермиса: 1 – на воздухе, 2 – под действием пропиленгликоля, 3 – под действием глицерина. Символы показывают усреднённые экспериментальные данные, кривые – результат аппроксимации, вертикальные линии – значения стандартного отклонения.

Исследование процесса испарения воды позволило отделить дегидратационный механизм оптического просветления от других механизмов (т.е. согласования

показателей преломления за счёт диффузии ОПА в межтканевое пространство и структурной модификации коллагена).

Изменение веса образцов кожи под действием воздуха и ОПА связано с потерей воды, поскольку вода является наиболее мобильным компонентом кожи. В случае пребывания ткани на воздухе вода испаряется из ткани, а при соприкосновении с ОПА – покидает ткань под действием осмоса.

С одной стороны, глицерин и пропиленгликоль, как гиперосмотические агенты, вызывают возникновение диффузии свободной воды из биоткани в окружающий раствор. С другой стороны, оба агента являются сильно гигроскопичными веществами и, находясь во влажной среде, связывают молекулы воды до достижения уровня насыщения. Пропиленгликоль менее гигроскопичен, чем глицерин, поэтому конечная степень дегидратации под действием пропиленгликоля выше, чем под действием глицерина. Таким образом, глицерин и пропиленгликоль препятствуют полной дегидратации биоткани за счёт удерживания воды внутри. Сравнение скоростей дегидратации кожи под действием обоих стимулов – испарения и осмоса – при перфорированном РСЭ показывает, что скорости обоих процессов близки. Нами предполагается, что в начальный период происходит только дегидратация биоткани. Постепенно раствор иммерсионного агента замещает воду в межтканевом пространстве и процесс дегидратации останавливается (см. образцы №2 и 3), в то время как под действием воздушного окружения потеря воды продолжается до полной дегидратации образцов, ограниченной влажностью окружающей среды (см. образец №1).

Полученные результаты позволяют утверждать, что оптическое просветление соединительной биоткани под действием рН-нейтральных гиперосмотических гигроскопичных оптических просветляющих агентов, примерами которых являются глицерин и пропиленгликоль, состоит из двух этапов, различающихся по скорости протекания. Механизм оптического просветления соединительной ткани под действием таких агентов обусловлен тремя процессами: во-первых, с наиболее быстрым процессом дегидратации ткани и, во-вторых, более медленным процессом замены воды иммерсионным агентом, что вызывает увеличение прозрачности биоткани за счёт повышения показателя преломления внутритканевой жидкости на первом этапе просветления, и в-третьих, со связыванием свободной воды агентами внутри ткани (наиболее медленный процесс), что, в свою очередь, вызывает некоторое снижение прозрачности на втором этапе оптического просветления.

Результаты исследования изменения диффузного отражения кожи крысы *in vivo* после инъекции 84.4%-ного водного раствора глицерина представлены в серии рисунков 3(а-в). В первые минуты (а) наблюдается снижение R_d кожи в среднем на 16%. При этом форма спектров практически не меняется. В спектрах диффузного отражения R_d интактной кожи *in vivo* отчетливо видно влияние трёх полос поглощения оксигенированного гемоглобина. В течение последующих 5-6 минут

наблюдается обратное явление – повышение коэффициента диффузного отражения приблизительно на 20% также без изменения формы спектров (б). В дальнейшем, вплоть до окончания измерений, уровень сигнала сохраняется, однако наблюдается деформация спектров отражения в спектральных диапазонах, соответствующих областям поглощения крови (в). На рисунке 3 (г) показана кинетика изменения коэффициента диффузного отражения кожи на нескольких длинах волн.

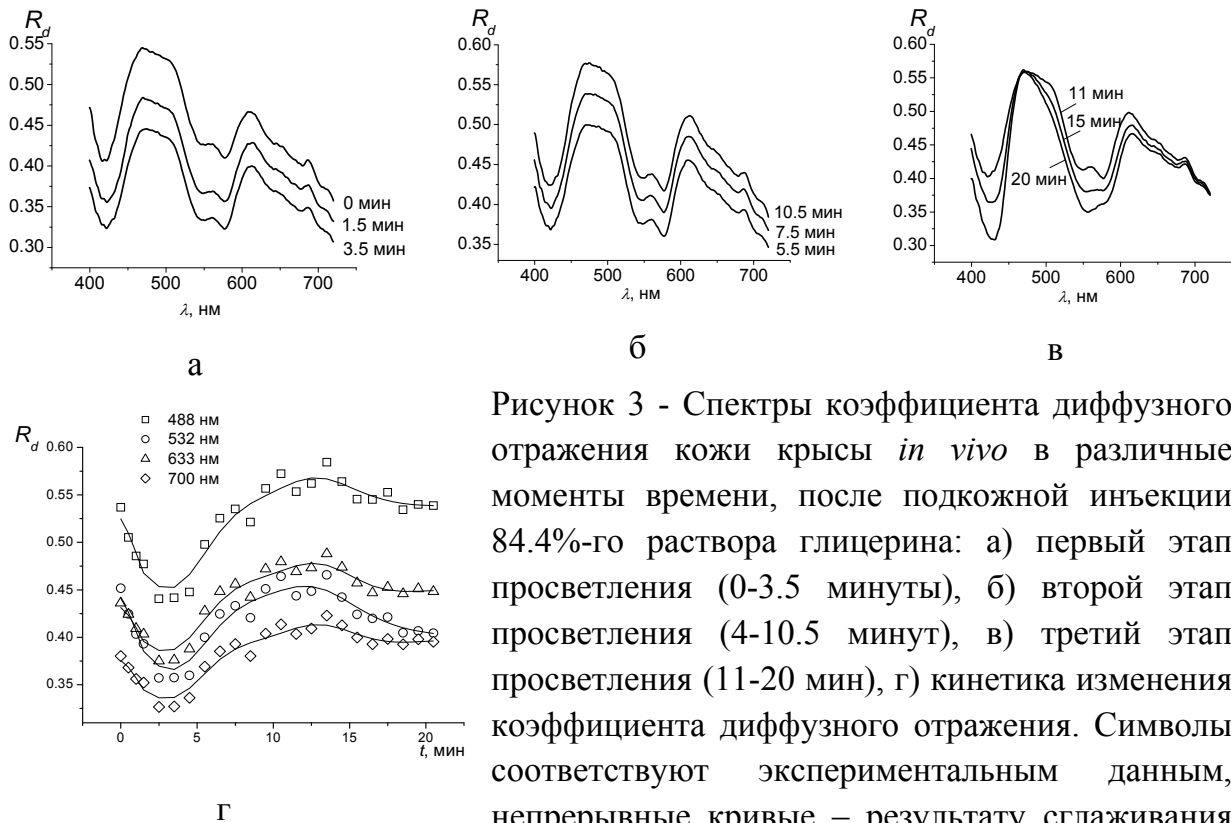


Рисунок 3 - Спектры коэффициента диффузного отражения кожи крысы *in vivo* в различные моменты времени, после подкожной инъекции 84.4%-го раствора глицерина: а) первый этап просветления (0-3.5 минуты), б) второй этап просветления (4-10.5 минут), в) третий этап просветления (11-20 мин), г) кинетика изменения коэффициента диффузного отражения. Символы соответствуют экспериментальным данным, непрерывные кривые – результату сглаживания по пяти точкам.

Анализ полученных спектров и кинетических кривых позволяет предположить, что воздействие раствора глицерина высокой концентрации непосредственно на дерму кожи *in vivo* можно приблизительно разделить на три этапа. На начальном этапе введение глицерина в дерму способствует оптической иммерсии, т.е. согласованию показателей преломления рассеивателей и окружающей их среды. Этот процесс отражается в уменьшении рассеяния кожи и, следовательно, снижении коэффициента отражения. С другой стороны, глицерин, как гиперосмотический агент, вызывает диффузию свободной воды из ткани, окружающей участок инъекции, в зону локализации глицерина. При этом он связывает молекулы воды в межфибрилярном пространстве. Таким образом, на втором этапе участок дермы под действием глицерина набухает. При этом показатель преломления раствора глицерина во внутритканевом пространстве снижается, по сравнению с первым этапом, что отражается в росте коэффициента отражения кожи.

Деформация спектров отражения на третьем этапе просветления связана с воздействием глицерина на микрососуды кожи. Изменение положения максимума поглощения гемоглобина в полосе Соре с 420 на 428 нм, снижение поглощения на длинах волн 547 и 577 нм и появление максимума поглощения на длине волны 555 нм соответствует переходу гемоглобина из оксигенированной формы в деоксигенированную. Этот процесс может быть вызван стазом микрососудов и капилляров дермы под действием глицерина [21].

Снижение коэффициента диффузного отражения относительно его значения для интактной кожи в течение 70-80 мин составило 1.5-1.8 раз в зависимости от длины волны, что близко к значениям, наблюдаемым для склеры. В отличие от области инъекции, на участке, окружающем эту область изменений спектра отражения в полосах поглощения гемоглобина крови не обнаружилось, что свидетельствует об отсутствии гемостаза.

При нанесении 40% раствора глюкозы на поверхность склеры *in vivo* также не наблюдалось перехода от оксигенированной к деоксигенированной форме гемоглобина.

Результаты исследований показали, что в зависимости от способа введения иммерсионного гиперосмотического агента в ткани (поверхностный или инъекционный) наблюдается различия в эффектах, сопровождающих оптическое просветление: в первом случае степень оптического просветления постепенно увеличивается (30-60 мин в зависимости от объекта исследования) за счёт диффузии иммерсионного агента внутрь ткани, при этом гемостаза в области воздействия не наблюдается; во втором случае оптическое просветление кожи происходит в два этапа: сначала быстрое просветление (в течение 3-4 мин), а затем наблюдается постепенный возврат к первоначальным параметрам, при этом в области инъекции наблюдается локальный гемостаз. Деоксигенация зависит также от свойств используемых гиперосмотических агентов. Например, 88%-ный раствор глицерина вызывал большую степень деоксигенации, чем 40%-ный раствор глюкозы.

В работе исследовалось оптическое просветление образцов черепной кости свиньи под действием пропиленгликоля. Впервые продемонстрирована принципиальная возможность оптического просветления черепной кости с помощью иммерсионного агента с высоким показателем преломления. Получено значительное снижение (до 70%) коэффициента диффузного отражения образца черепной кости, погружённого в пропиленгликоль, в спектральном диапазоне 450-1000 нм в течение 20 мин.

Механизмы воздействия 40%-ного раствора глюкозы на скелетную мышцу исследовались с помощью ОКТ. На рисунке 4 представлены ОКТ-изображения мышечной ткани до оптического просветления с помощью 40%-ного раствора глюкозы (раствор для инъекции) и в различные моменты после его начала. Хорошо видна слоистая структура ткани (цифрами обозначены визуализируемые слои).

Отрезками и буквой δ отмечена оптическая глубина детектирования биоткани.

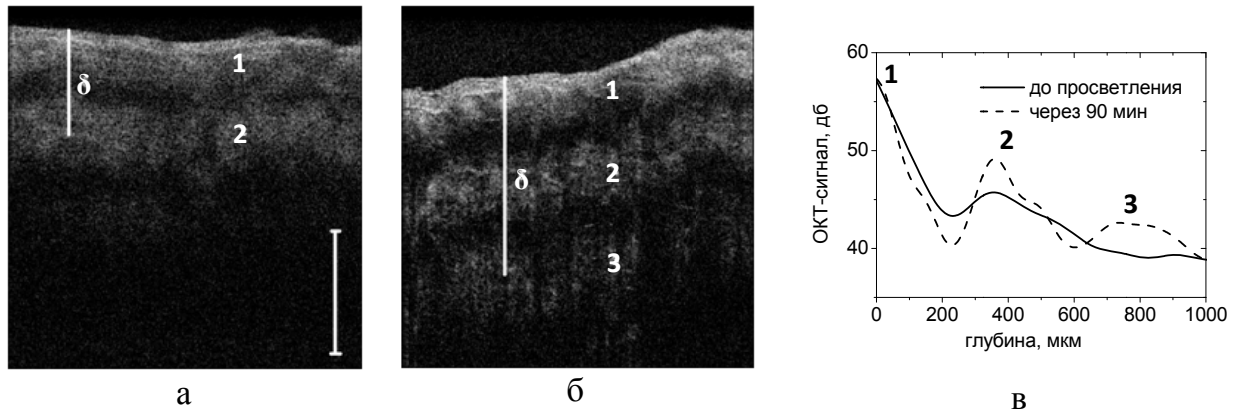


Рисунок 4 - ОКТ-изображения мышечной ткани быка до оптического просветления (а) и 90 мин (б) после погружения в 40% водный раствор глюкозы. Масштабная метка соответствует 0.5 мм. Отрезком и буквой δ обозначена оптическая глубина детектирования. Цифрами обозначены визуализируемые слои биоткани.

Из представленных рисунков следует, что в процессе оптического просветления плотность упаковки миофибрилл уменьшается за счёт увеличения расстояния между фибриллами. Межфибрилярное пространство становится практически прозрачным на ОКТ-изображениях, что говорит о том, что проникновение раствора глюкозы происходит в первую очередь в межфибрилярное пространство мышечной ткани. Хорошо видно, что постепенное проникновение ОПА из межфибрилярного пространства внутрь миофибрилл позволяет визуализировать их структурные неоднородности.

Оптическая глубина детектирования интактной мышечной ткани по данным оценки ОКТ-изображений составила 350 ± 20 мкм. Через 90 мин после начала воздействия раствора глюкозы оптическая глубина детектирования увеличилась до 830 ± 20 мкм, т.е. приблизительно в 2.4 раза. Контраст ОКТ-изображений увеличился в 4 раза. При этом наблюдалось расширение внутритканевого пространства между миофибриллами, т.е. набухание биоткани, за счёт низкого рН (~ 3.5) используемого раствора глюкозы. Данный эффект сходен с эффектами, наблюдаемыми при воздействии аналогичного раствора глюкозы на соединительные ткани (склера, ТМО, дерма кожи).

На основе результатов измерения коэффициента коллимированного пропускания нами оценивалась степень (эффективность) оптического просветления образцов биоткани как относительное изменение усреднённого коэффициента ослабления света образцами биоткани в исследуемом диапазоне длин волн:

$$\Delta \mu_t = \frac{\mu_t(t=0) - \mu_t(t)}{\mu_t(t=0)} \times 100\%, \quad (3)$$

где $\mu_t(t=0)$ – начальный коэффициент ослабления интактного образца биоткани, $\mu_t(t)$

- значение коэффициента ослабления в различные моменты времени. Аналогично можно рассчитать значение степени оптического просветления, исходя из оценки коэффициента ослабления на основе ОКТ-измерений [уравнение (2)].

Глава 3 посвящена исследованию повышения контраста ОКТ визуализации сосудов и оптических неоднородностей в печени с помощью наночастиц за счёт увеличения рассеяния биоткани. В работе использовались частицы диоксида титана (TiO_2) (634662-100G, Sigma-Aldrich Co., США) с размером порядка 100 нм и золотые наночастицы (ЗНЧ), представляющие собой полые наноклетки размером около 50 нм. Частицы TiO_2 имели полосу поглощения в области длинноволнового ультрафиолета. Коллоид ЗНЧ имел резонансное поглощение на длине волны 785 нм.

Смещение длины волны в сторону более длинных волн, на которых производилось ОКТ-сканирование, значительно уменьшает влияние поглощения. Таким образом, можно считать, что основной вклад в увеличение ОКТ сигнала от биоткани с наночастицами вносит только дополнительное рассеяние и отражение.

Для серии модельных экспериментов использовалась бычья печень *in vitro*. Модельные образцы разделялись на две серии: I серия включала эксперименты с суспензиями частиц TiO_2 , II серия – с ЗНЧ. УЗ воздействие применялось для увеличения глубины внедрения наночастиц и более равномерного их распределения в тканях печени. В качестве источника ультразвука использовался УЗ излучатель Dinatron 125 (Dinatronics, США). Частота УЗ - 1 МГц, плотность мощности - 1.5 Вт/см² в непрерывном режиме.

Для серии *ex vivo* исследований печень была получена от 4 животных - белых аутбредных лабораторных крыс. Инъекция суспензии ЗНЧ (100 мкг/мл) производилась *in vivo* в бедренную вену. Объём вводимой суспензии составлял 2 мл/кг. Через 24 часа печень извлекалась из брюшной полости для проведения измерений.

Образцы разделялись на две группы: 1) контрольные образцы, полученные от животных, не подвергавшихся воздействию и 2) экспериментальные образцы, полученные от животных, которым суспензия наночастиц вводилась внутривенно.

ОКТ сканирование проводилось до обработки и после соответствующей обработки (в зависимости от группы) образцов печени быка в *in vitro* исследованиях и непосредственно после удаления печени крысы в *ex vivo* исследованиях.

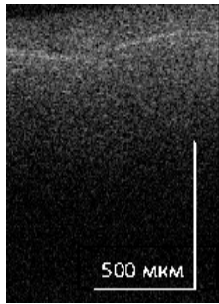
Контраст изображения сосудов печени на ОКТ изображениях оценивался по формуле:

$$\text{Контраст} = \frac{|R(z_1) - R(z_2)|}{R(z_1) + R(z_2)}, \quad (4)$$

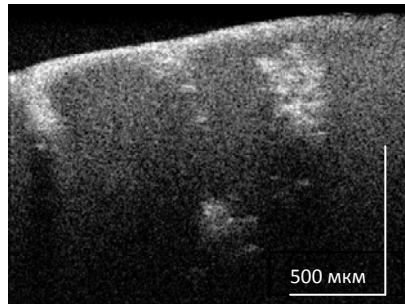
где $R(z_1)$ и $R(z_2)$ – соответственно максимальная и минимальная амплитуды усредненного по 3-5 А-сканам ОКТ-сигнала в области неоднородности. В модельных экспериментах *in vitro* значения контраста рассчитывались на двух оптических глубинах 300 и 500 мкм. В случае *ex vivo* экспериментов значение контраста

определялось на оптической глубине порядка 200 мкм. Кроме того оценивалась оптическая глубина детектирования неоднородностей в ткани печени.

Структура ткани печени на ОКТ изображении (см. рис. 5а) достаточно однородна. Неразличимость внутренней структуры образца на изображении связана с тем, что показатели преломления ткани печени (1.38 [22]) и стенок сосудов, пронизывающих печень (1.36-1.39 [22]) в диапазоне длин волн, на котором происходит сканирование, достаточно близки.



а



б

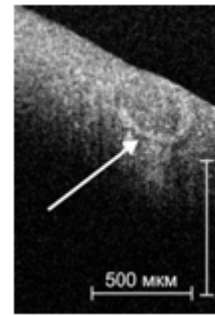


Рисунок 5 - ОКТ изображения образцов печени быка *in vitro*: (а) - контрольный (интактный) образец (б) – образец после 10-ти минутного воздействия УЗ на поверхность биоткани, покрытую суспензией наночастиц TiO_2 в ПЭГ-300.

Рисунок 6 - ОКТ изображение образца печени крысы *ex vivo* через 24 часа после внутривенной инъекции суспензии наночастиц *in vivo*. Стрелкой обозначено изображение кровеносного сосуда.

Использование суспензии частиц TiO_2 позволило повысить оптическую глубину детектирования неоднородностей биоткани по сравнению с интактным состоянием. В случае, когда суспензия использовалась без дополнительной обработки УЗ, оптическая глубина детектирования составила ~ 500 мкм. При 10-ти минутном воздействии УЗ она достигла 800 мкм (см. рис. 5б). Контраст изображений увеличился в 1.6 раз.

В результате ОКТ исследования ткани печени *ex vivo*, через 24 часа после внутривенного введения суспензии наночастиц, получены контрастные изображения сосудов печени на оптической глубине порядка 200 мкм за счёт локализации в них золотых наночастиц (рис. 6). Контраст визуализации сосудов увеличился более чем в 1.5 раза.

Селективное увеличение поглощающих свойств биотканей *in vivo* широко используется как для диагностических, так и для терапевтических и хирургических целей. Эффективное изменение поглощения живых тканей может быть достигнуто за счёт их окрашивания с помощью биосовместимых красителей. В Главе 4 представлены результаты исследования взаимодействия фотосенсибилизаторов метиленового синего (МС) со слизистой оболочкой и индоцианинового зелёного (ИЗ) с кожей в процессе их распространения при использовании водных растворов

красителей, а также растворов ИЗ в этиловом спирте, пропиленгликоле и глицерине.

Материалом для исследования диффузии МС послужили 10 биоптатов слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи, полученных при проведении гайморотомии у больных с хроническим гнойным гайморитом. В качестве исследуемого раствора использовался 0.1%-й раствор МС в физиологическом растворе NaCl.

Материалом для исследования диффузии растворов ИЗ в биоткани послужили образцы кожи белых аутбредных лабораторных крыс. Для исследований использовался ИЗ в следующих растворителях: дистиллированная вода, 50% водный раствор этилового спирта, 50% водный раствор глицерина, 50% водный раствор пропиленгликоля. Концентрация ИЗ во всех растворах составляла 1 мг/мл.

Все измерения проводились при комнатной температуре.

Для проведения спектрофотометрических измерений образцы биоткани закреплялись на специальной цилиндрической кювете, предварительно заполненной исследуемым раствором. Кювета закреплялась в штативе горизонтально так, чтобы раствор соприкасался с поверхностью образца. Образец кожи закреплялся таким образом, чтобы проникновение красителя происходило со стороны дермы, а регистрация спектров диффузного отражения осуществлялась со стороны эпидермиса.

С противоположной стороны к образцу подводился волоконно-оптический зонд, состоящий из 7 волокон, центральное волокно (источник) служило для транспорта излучения в биоткань, а шесть других (детекторы), симметрично расположенных по окружности вокруг центрального волокна - для сбора обратно рассеянного излучения.

Для количественной оценки изменения содержания красителя в биоткани использовался метод, предложенный в работах [23, 24], основанный на использовании модифицированного закона Бугера-Ламберта-Бера, согласно которому эффективная оптическая плотность (ЭОП) биоткани A определяется как

$$A = -\ln(R) = \mu_a \rho \sigma + G, \quad (5)$$

где R – коэффициент отражения биоткани, μ_a – коэффициент поглощения, ρ – расстояние между источником и детектором, σ – дифференцированный фактор длины пути фотона, учитывающий удлинение траектории регистрируемых фотонов, обусловленное многократным рассеянием, и G – константа, определяемая геометрией среды и эксперимента. Для упрощения вычислений произведение $\rho\sigma$ может быть заменено величиной L , которая представляет собой эффективную длину пути регистрируемых фотонов и зависит как от поглощающих, так и от рассеивающих характеристик среды, а также от расстояния между источником и детектором.

Разность ЭОП образца биоткани, полученная из измерений в начальный момент и в различные моменты времени при проникновении красителя в биоткань, определялась следующим образом:

$$\Delta A(t, \lambda) = A(t, \lambda) - A(t = 0, \lambda) = \Delta \mu_a(t, \lambda) L. \quad (6)$$

Процесс транспорта красителей в биотканях носит сложный характер, т.к. сопровождается взаимодействием молекул красителя с биотканями, димеризацией, агрегацией и т.д., поэтому использование понятия коэффициента диффузии в его классическом представлении в данном случае неприменимо. Однако для описания кинетики проникновения красителей в биоткани может быть введён аналог коэффициента диффузии, «эффективный коэффициент диффузии», который оценивается по изменению оптических параметров биоткани в процессе окрашивания. Данное представление является упрощённым и обобщённым, т.к. не учитывает особенности молекулярного взаимодействия красителей с биотканями, которые в каждом конкретном случае могут существенно различаться, но позволяет получить представление о скорости окрашивания биоткани в целом.

Для описания проникновения абстрактного красителя в биоткань использовалась модель свободной диффузии [23, 25] со следующими допущениями при описании процесса переноса: 1) имеет место только концентрационная диффузия, т.е. поток красителя в биоткань в данной точке пропорционален градиенту концентрации красителя в этой точке; 2) коэффициент диффузии постоянен во всех точках внутри исследуемого образца биоткани; 3) под коэффициентом диффузии понимается эффективный коэффициент диффузии.

Рисунок 7 демонстрирует результат вычисления разностной ЭОП (см. уравнение 7) для одного из образцов слизистой оболочки. На рисунке хорошо видно, что в процессе проникновения МС в биоткань меняется соотношение высоты амплитуд полос поглощения красителя. Это связано, во-первых, с переходом молекул красителя из мономерной формы в димерную при увеличении концентрации МС в биоткани. Кроме того, электростатическое взаимодействие положительно заряженной молекулы красителя с отрицательно заряженными участками протеинов клеточных мембран вызывает димеризацию смежных молекул красителя, связанных с анионными участками полимеров и формирует связанные димеры на внешней поверхности клеток [4].

На рисунке 8 показана типичная кинетика изменения ΔA образца слизистой оболочки при её окраске МС, измеренная на длине волны 670 нм. Величина $\varepsilon C_0 L$ (где $\varepsilon(\lambda)$ - молярный коэффициент поглощения красителя, C_0 - концентрация красителя в растворе, D - коэффициент диффузии, t - время) оценивалась, исходя из анализа кинетики изменения ΔA при окрашивании образца биоткани, по линейному участку зависимости разностной ЭОП от времени, соответствующему прекращению изменения ΔA .

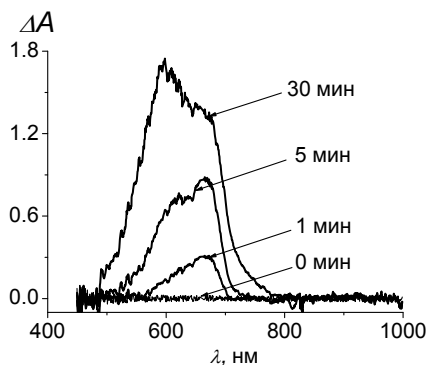


Рисунок 7 – Спектральная зависимость разности ЭОП образца слизистой оболочки под действием раствора МС в различные моменты времени.

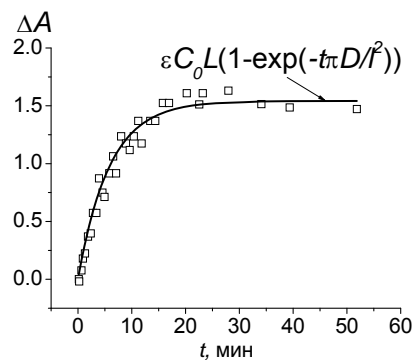


Рисунок 8 – Кинетика разности ЭОП образца слизистой оболочки при его окрашивании МС. Символы соответствуют экспериментальным данным, сплошная кривая - аппроксимация экспериментальных данных в рамках предложенной модели.

Коэффициент диффузии определялся путем минимизации целевой функции:

$$f(D) = \sum_{i=1}^{N_t} (\Delta A(D, t_i) - \Delta A^*(t_i))^2, \quad (7)$$

где N_t - общее количество экспериментальных точек, полученное при регистрации динамики коэффициента отражения на некоторой фиксированной длине волны, $\Delta A(D, t)$ - ЭОП, рассчитанная в момент времени t при заданном значении D ; $\Delta A^*(t)$ - экспериментально измеренное значение ЭОП в момент времени t . Для минимизации целевой функции использовался «комплексный» метод минимизации [26]. Вычисления для каждого образца выполнялись для десяти длин волн в спектральной области 600-700 нм и полученные значения усреднялись. Среднее значение эффективного коэффициента диффузии и среднеквадратичный разброс данных, усредненных по всем 10 образцам слизистой оболочки, составили $(4.8 \pm 2.9) \times 10^{-7}$ см²/с. Большой разброс полученных результатов объясняется разбросом оптических параметров образцов, взятых от различных пациентов.

Аналогичным образом экспериментально исследован транспорт индоцианинового зелёного, растворённого в воде и водных растворах спиртов (глицерина, пропиленгликоля и этанола), в дерме с помощью спектроскопии обратного рассеяния. В процессе проникновения обнаружено значительное (до 40 нм) смещение в коротковолновую область спектра максимума поглощения ИЗ в дерме и образование агрегированной формы красителя при использовании в качестве растворителей 50%-ных водных растворов глицерина и пропиленгликоля. При диффузии индоцианинового зелёного, растворённого в этаноле, подобного смещения и агрегации не наблюдалось.

Получены значения эффективного коэффициента диффузии ИЗ в дерме при использовании следующих растворителей, которые позволяют оценить скорость окрашивания биотканей: вода - $(7.7 \pm 2.51) \times 10^{-7}$, 50%-ный водный раствор глицерина - $(1.0 \pm 0.3) \times 10^{-8}$, 50%-ный водный раствор пропиленгликоля - $(4.0 \pm 0.2) \times 10^{-8}$ и 50%-ный водный раствор этанола - $(1.88 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ см²/с.

Методики фототерапии гайморита [4 (список *)] и гингивита [33 (список *)] с использованием раствора метиленового синего и лазерного излучения красного спектрального диапазона представлены в приложениях 1 и 2. На основе полученных данных о транспорте индоцианинового зелёного в коже разработаны методики фототерапии и фототермолиза акне [24, 25 (список*)]. Описание методик представлено в приложении 3.

Усилению проницаемости кожи для различных препаратов, в том числе лекарств, гиперосмотических иммерсионных агентов и частиц посвящено большое количество исследований. Однако сложности, связанные с преодолением рогового слоя эпидермиса, особенно в условиях *in vivo*, до сих пор не позволили однозначно решить эту задачу, поэтому разработка новых эффективных методов чрескожной доставки препаратов остаётся по-прежнему актуальной. Сравнительное исследование химических и мультимодальных (физико-химических) подходов к усилению трансдермального и трансэпидермального транспорта препаратов может быть полезно для развития новых и оптимизации уже существующих методов направленной доставки лекарств и других агентов.

Глава 5 посвящена решению проблемы доставки фотосенсибилизаторов, иммерсионных агентов и наночастиц в кожу *in vivo* с помощью химических энхансеров (этанол и ДМСО) и мультимодальных методов повышения проницаемости рогового слоя эпидермиса (ДМСО с УЗ воздействием).

Для исследований влияние этанола на усиление диффузии красителей через роговой слой эпидермиса использовались следующие фотодинамические красители: МС, растворённый в физиологическом растворе (0.9% NaCl) и 40%-ном растворе этанол/физиологический раствор и ИЗ, растворённый в дистиллированной воде и 40%-ном растворе этанол/физиологический раствор. Концентрация красителей в растворах составляла 1 мг/мл.

Материалом для исследования проникновения каждого из красителей в биоткани послужило по 10 образцов кожи белых аутбредных лабораторных крыс.

Описание экспериментальной установки и метода расчёта эффективного коэффициента диффузии дано в главе 4. Существенным отличием является то, что образец кожи располагался таким образом, чтобы проникновение красителя происходило со стороны эпидермиса, а регистрация спектров диффузного отражения осуществлялась со стороны дермы.

В результате проведённых исследований получено, что при взаимодействии рогового слоя эпидермиса с изотоническим раствором метиленового синего (МС) и

водным раствором индоцианинового зелёного (ИЗ), полного окрашивания образца кожи за время наблюдения (4-6 часов) не происходило. При использовании в качестве усилителя диффузии красителей 40%-ного спиртового раствора, наблюдалось полное окрашивание образца в течение 1.5-2 часов для МС и 6-7 часов для ИЗ, в результате чего удалось оценить их эффективный коэффициент диффузии в коже через роговой слой эпидермиса, который составил соответственно $(2.2 \pm 0.9) \times 10^{-6}$ и $(6.85 \pm 3.75) \times 10^{-7}$ см²/с.

Для исследования диффузии ОПА была приготовлена смесь дегидратированного глицерина и полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400) в равной пропорции. Смесь была разделена на две части. В одну из них добавлялся ДМСО (99%, Sigma, США) для получения 9%-ного раствора ДМСО-ОПА.

В работе использовался концентрированный коллоид наноболочек с диаметром силикатного ядра 120 нм и толщиной оболочки 20 нм с полосой поглощения в диапазоне длин волн 800-1000 нм.

В качестве модели повреждения кожи использовался экспериментальный аллергический контактный дерматит (АКД) у крыс. Эксперименты были выполнены на самцах белых аутбредных лабораторных крыс.

Животные были разделены на 8 групп (по трое животных в каждой группе): с I по IV группы составляли животные с АКД и с V по VIII группы – с неповрежденной кожей. Неповрежденная кожа предварительно депилировалась. У каждого животного на спине выделялось по два участка. Для исследования проницаемости кожи для ЗНЧ на оба участка кожи экспериментальных животных из I и V групп наносили суспензию, содержащую ЗНЧ в комплексе с ДМСО, а из II и VI групп – суспензию, содержащую ЗНЧ без ДМСО. Время экспозиции на одном из участков составляло 20 минут. Второй участок для усиления трансдермального переноса ЗНЧ подвергался УЗ воздействию с частотой 1 МГц, мощностью 1.1 Вт и общей длительностью 4 мин (2 раза по 2 мин). Контрольными служили III, IV, VII и VIII группы, для которых исследовалась проницаемость поврежденной и здоровой кожи для иммерсионного раствора, являющегося основой суспензии, без ЗНЧ. При этом для III и VII групп в состав раствора включался ДМСО, а для IV и VIII – нет. Обработка исследуемых участков кожи для данных групп осуществлялась аналогично описанному выше.

Для неинвазивного определения зон аккумуляции ЗНЧ в коже и оценки коэффициента ослабления зондирующего света использовалась ОКТ, которую проводили для животных всех экспериментальных групп. Коэффициент ослабления света на участке биоткани μ_t рассчитывался с помощью модели однократного рассеяния аналогично алгоритму, представленному в главе 2.

Эффективность оптического просветления дермы с помощью химического и физического усилителей проницаемости оценивалась, исходя из разности между измеренными значениями μ_t контрольных и обработанных участков кожи (см. уравнение 3).

Рисунок 9 демонстрирует значения коэффициента ослабления света кожей с поврежденным эпидермальным слоем, и здоровой кожи при различных способах внедрения суспензии ЗНЧ или иммерсионного раствора, являющегося основой суспензии, нормированные на начальные значения.

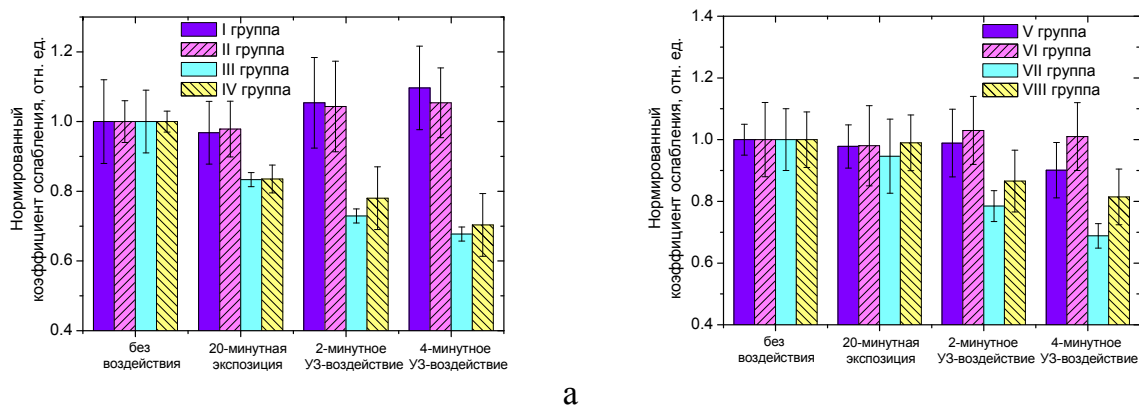


Рисунок 9 - Нормированные значения коэффициента ослабления света кожей в группах экспериментальных животных с аллергическим контактным дерматитом (а) и интактной кожей (б), подвергнутых различным способам внедрения суспензии золотых наночастиц и основы суспензии.

Данные различия в динамике изменения μ_t связаны с присутствием в исследуемых агентах ЗНЧ. Так, во всех группах животных, в которых использовалась основа суспензии без ЗНЧ, наблюдалось заметное уменьшение коэффициента ослабления по сравнению с первоначальными значениями, что связано с иммерсией кожи при её взаимодействии с основой используемой суспензии.

Из рисунка следует, что при отсутствии нарушения рогового слоя эпидермиса внедрение наночастиц в дерму неэффективно. Для усиления транспорта наночастиц в кожу при её патологических изменениях, связанных с повреждением защитного барьера, достаточно использования только УЗ воздействия.

Рисунок 10 демонстрирует результаты расчёта Δ^{μ_t} , которые позволяют оценить эффективность различных методов усиления проникновения иммерсионных просветляющих агентов по отношению к контролю, соответствующему группе животных с интактной поверхностью кожи, не подвергавшейся воздействию. Для этой группы $\Delta^{\mu_t} = 0$. Хорошо видно, что колонка ОПА имеет минимальную высоту, что означает наименьшую эффективность 20-ти минутного воздействия ОПА на поверхность интактной кожи (т.е. отсутствие оптического просветления). 20-ти минутное применение раствора ДМСО-ОПА менее эффективно, чем 4-х минутный ультразвукофорез. Однако максимальная эффективность оптического просветления наблюдалась при комбинированном использовании УЗ-ДМСО-ОПА в течение 4 мин. В последнем случае степень оптического просветления дермы приблизительно

совпадает со степенью просветления дермы при отсутствии рогового слоя эпидермиса.

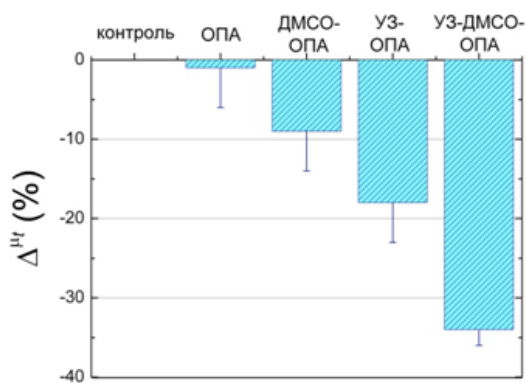


Рисунок 10 - Эффективность различных методов усиления проникновения иммерсионных просветляющих агентов в кожу *in vivo*. Колонка «контроль» соответствует данным, полученным до воздействия, «ОПА» - 20-ти минутное местное воздействие смеси глицерина и ПЭГ-400, «ДМСО-ОПА» - 20-ти минутное воздействие смеси ДМСО-ОПА, «УЗ-ОПА» - 4-х минутное воздействие ультразвука и ОПА и «УЗ-ДМСО-ОПА» - совместное 4-х минутное воздействие ультразвука и смеси ДМСО-ОПА.

Микропорация биоткани широко используется в качестве средства повышения её проницаемости для лекарств. Однако проблема повышения эффективности чрескожной доставки необходимых препаратов, ОПА и частиц остаётся по-прежнему актуальной. При этом возможности микропорации далеко не исчерпаны и требуют дальнейших исследований и развития. Кроме того, вызывает большой интерес реакция организма, время и пути вывода нерастворимых микро- и наночастиц, внедрённых в кожу, на различную глубину.

В **Главе 6** представлены различные методики фракционной микроабляции кожи для улучшения доставки иммерсионных агентов, лекарственных препаратов и частиц. В работе исследовалась эффективность повышения проницаемости эпидермиса при его оптотермической микроабляции, а также использовались частицы различного состава и широкого размерного диапазона для тестирования различных режимов лазерной микроабляции.

В настоящее время одним из эффективных источников излучения для ФЛМА является импульсный лазер Er:YAG. Он генерирует излучение на длине волны 2940 нм, которое эффективно поглощается молекулами воды. В результате поверхностного облучения кожи с помощью данного лазера, можно осуществлять фракционную абляцию РСЭ с пониженным термическим повреждением окружающей ткани. Преимуществами использования Er:YAG лазера для абляции являются достаточно короткое время заживления, малая эритема и незначительная пигментация [27, 28].

В результате воздействия широким пучком с помощью стандартной системы на основе Er:YAG лазера StarLux/Lux2940 (Palomar Medical Technologies Inc., США)

нами осуществлялась абляция верхнего слоя кожи на площади $6 \times 6 \text{ мм}^2$ с глубиной повреждения менее 50 мкм.

Для исследования оптического просветления кожи в работе использовался полиэтиленгликоль 300 (ПЭГ-300). Показатель преломления ПЭГ-300 на длине волны 930 нм составляет 1.456.

Исследования выполнялись на лабораторных крысах-альбиносах *in vivo*, которые были разделены на 3 равные группы: I группа – лазерная абляция (ЛА), II группа – однократное нанесение ПЭГ-300 на интактную кожу, и III группа – ЛА с последующим однократным нанесением ПЭГ-300. Перед проведением экспериментов животные подвергались анестезии.

Мониторинг состояния кожи в процессе оптического просветления осуществлялся с помощью ОКТ. По наклону ОКТ-сканов оценивался коэффициент ослабления μ_t (см. уравнение 2)

Эффективность оптического просветления оценивалась для каждого исследуемого участка отдельно с помощью выражения (4). Значения эффективности оптического просветления рассчитывались для каждого животного, усреднялись внутри группы в каждый момент ОКТ измерения, и рассчитывалось соответствующее стандартное отклонение.

На рисунке 11 представлены значения эффективности оптического просветления кожи в разных экспериментальных группах, для нескольких временных интервалов.

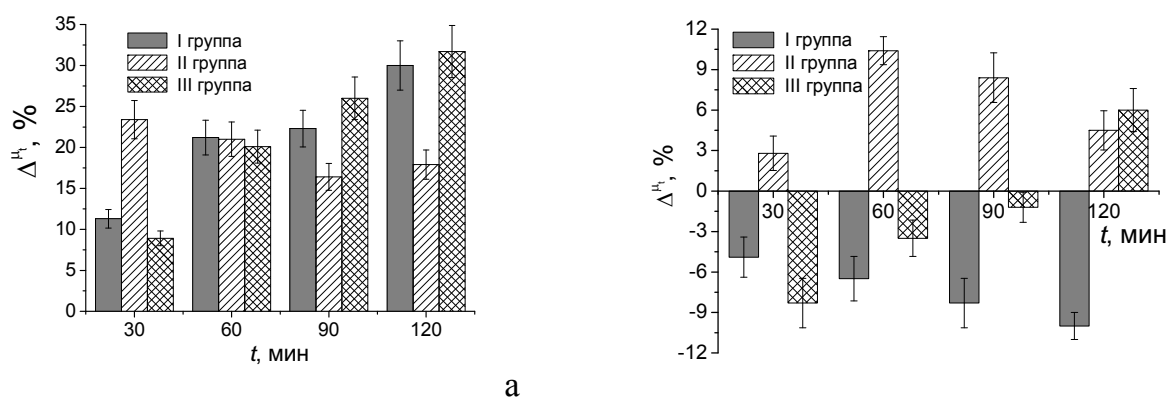


Рисунок 11 - Временные зависимости для эффективности оптического просветления кожи в трёх исследуемых группах экспериментальных животных на глубине а) от 50 до 170 мкм и б) от 150 до 400 мкм.

В результате исследований показано, что использование лазерной абляции для усиления диффузии гидрофильных агентов в кожу, сопровождалось увеличением светорассеяния дермы за счёт притока к месту повреждения внутритканевой жидкости и лимфы. Однако в поверхностных слоях кожи (глубиной до 150 мкм) эффект увеличения рассеяния в биоткани компенсировался интенсивным испарением воды через зону повреждения, оптическое просветление ткани увеличивалось с

течением времени, причём нанесение иммерсионного агента не оказывало существенного влияния на степень оптического просветления. Таким образом, влияние дегидратационного механизма увеличивало эффективность оптического просветления кожи по сравнению с чисто иммерсионным почти в 1.8 раз в течение 120 мин. В более глубоких слоях кожи (от 150 до 400 мкм) при абляции также наблюдалось повышение светорассеяния. Дополнительное воздействие ОПА увеличивало оптическое просветление кожи за счёт улучшения согласования показателей преломления компонентов дермы, но максимальная эффективность оптического просветления не превышала 6%.

В данной главе также представлены результаты разработки новых методов доставки частиц различных диаметров, формы и материала. Система StarLux/Lux2940 оснащена портативными фракционными насадками, с помощью которых на коже можно создавать микроучастки абляции. Это достигается системой линз, расщепляющих первоначальный луч на соответствующее количество пучков. Различные насадки позволяют получать одновременно сетку из 169 микроканалов на площади $6 \times 6 \text{ мм}^2$ или 5 насечек на площади $5 \times 5 \text{ мм}^2$. Глубина каналов и насечек зависит от энергии и длительности импульсов. Временной профиль импульса представляет собой серию пиков с длительностью 200 мс каждый.

В работе использовались несколько типов частиц, различающихся как по составу, так и по размеру: частицы диоксида титана (TiO_2) с характерным размером $\sim 100 \text{ нм}$, оксида циркония (ZrO_2) $\sim 5 \text{ мкм}$ и оксида алюминия (Al_2O_3) $\sim 27 \text{ мкм}$ в качестве разномасштабных тестовых агентов, и композитные наночастицы - золотые наноклетки, покрытые оболочкой из двуокиси кремния. Все типы частиц являются биосовместимыми.

Последовательность действий при ФЛМА и внедрении частиц проиллюстрирована на рисунке 12.

Каждое наблюдение включало фотографирование поверхности кожи с помощью цифровой камеры Nikon D80 (Nikon Inc., Япония), оборудованной макро объективом Micro-Nikkor (Nikon Inc., Япония), измерение спектра отражения, ОКТ сканирование и гистологический анализ биопсии с исследуемых участков. Наблюдения проводились от трёх до четырёх недель.

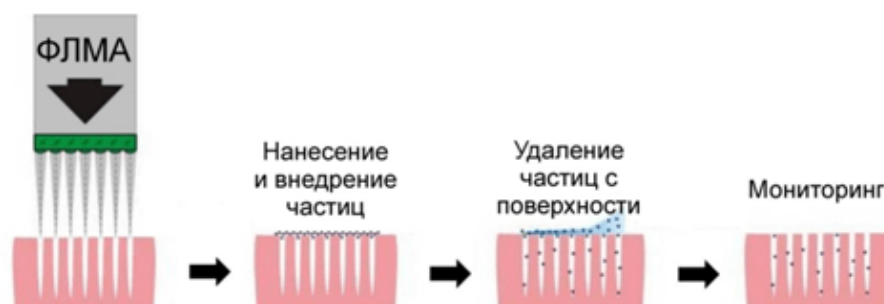


Рисунок 12 - Последовательность действий при чрескожной доставке частиц.

Результаты спектральных и ОКТ исследований показали, что при внедрении

частиц данных размеров на глубину 300-400 мкм, они остаются там после заживления каналов в течение месяца.

Данное наблюдение подтверждается результатами гистологического анализа. Гистологические срезы позволяют наблюдать локализацию наночастиц в глубоких слоях кожи. На рисунке 13 представлены гистологические препараты, изготовленные из материала, полученного при биопсии обработанного и контрольного (т.е. не подвергнутого обработке) участков кожи.

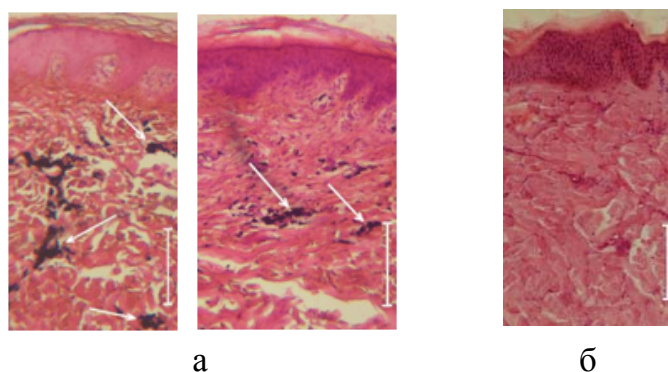


Рисунок 13 - Фотография гистологического препарата биопсии кожи минипига через (а) три недели после проведения микроабляции и внедрения наночастиц TiO_2 в кожу; (б) – контрольный участок. Препарат окрашивался гематоксилином и эозином. Высота вертикальной метки соответствует 100 мкм. Стрелками указаны области залегания наночастиц.

На снимке гистологических срезов (а) хорошо видны проникшие вглубь наночастицы TiO_2 (области, отмеченные стрелками). По полученному снимку можно оценить глубину проникновения наночастиц вглубь кожи, которая варьируется от 150 до 400 мкм, что свидетельствует о проникновении частиц в дерму кожи. В области эпидермиса частиц не обнаружено. В контрольной области, находящейся на удалении от участков микроабляции (см. рис. 13 б), частицы также не обнаруживались.

В результате проведённых исследований разработаны методики и исследованы особенности применения фракционной оптотермической и лазерной микроабляций для улучшения внедрения иммерсионных агентов и разномасштабных частиц *in vitro* и *in vivo*.

Уточнены механизмы оптического просветления при создании в верхнем слое эпидермиса зон повреждения. Получено, что скорость диффузии воды из кожи через эпидермис в окружающий гиперосмотический раствор, а также гиперосмотического иммерсионного агента через эпидермис увеличивается при использовании микроперфорации рогового слоя эпидермиса, при этом существенно увеличивается вклад дегидратации в оптическое просветление кожи.

Показано, что абляция рогового слоя эпидермиса вызывает увеличение светорассеяния дермы за счёт притока к месту повреждения внутритканевой

жидкости и лимфы, что снижает эффективность оптического просветления кожи иммерсионными агентами сразу после абляции по сравнению с просветлением без абляции.

Протестированы различные режимы фракционной лазерной микроабляции с помощью импульсного Er:YAG лазера для создания в коже *in vivo* микроканалов различной глубины и насечек, позволяющих осуществлять чрескожную доставку частиц различных размеров, исследованы реакция организма, время и пути вывода нерастворимых микро- и наночастиц, внедрённых в кожу, на различную глубину.

Предложен новый метод доставки наночастиц в кожу с помощью фракционной лазерной микроабляции поверхности кожи и воздействия ультразвука, при котором глубина внедрения частиц (300-400 мкм) позволяет создавать в коже долговременное депо.

Методика направленной доставки лекарственных препаратов в кожу с помощью ФОТМА эпидермиса представлена в приложении 4 [30 (список *)]. Пример доставки биodeградируемых микроконтейнеров в глубокие слои кожи с помощью ФЛМА, создание депо внутри дермы и мониторинг высвобождения препарата в процессе растворения микроконтейнеров представлен в приложении 5 [37 (список *)].

В **Заключении** перечислены следующие основные результаты и выводы работы:

1. Исследованы механизмы взаимодействия гидрофильных гиперосмотических иммерсионных агентов с мышечной и различными типами соединительной ткани *in vitro* и *in vivo*. Получено, что процесс оптического просветления *in vitro* носит двухстадийный характер. На первом этапе происходит увеличение прозрачности биоткани, а на втором – некоторое снижение. Увеличение прозрачности биотканей происходит за счёт согласования показателей преломления коллагеновых волокон и внутритканевой жидкости при замещении её на иммерсионные агенты и сопровождается дегидратацией, вызванной гиперосмотическими свойствами используемых агентов. Механизмы снижения прозрачности ткани под действием иммерсионных агентов обусловлены их взаимодействием с макромолекулами коллагена. При замещении молекул воды в гидратной оболочке коллагена на молекулы просветляющих агентов плотность упаковки коллагеновых волокон уменьшается, что приводит к некоторому повышению рассеяния ткани.
2. Установлено существование оптимального времени воздействия иммерсионной жидкости на биоткань, при котором достигается максимально возможная степень оптического просветления.
3. Для агентов, обладающих гигроскопичными свойствами (например, глицерин, пропиленгликоль), уменьшение прозрачности ткани после достижения максимальной степени оптического просветления, происходит за счёт связывания агентами молекул воды во внутритканевой жидкости (вторичная гидратация). Вследствие этого показатель преломления внутритканевой жидкости уменьшается, что выражается в увеличении рассеяния ткани.

4. В зависимости от способа введения иммерсионного гиперосмотического агента в кожу *in vivo* (поверхностный или инъекционный) наблюдается различия в эффектах, сопровождающих оптическое просветление. Так при поверхностном нанесении концентрированного раствора иммерсионного агента степень оптического просветления постепенно увеличивается и достигает максимального значения через 30-60 мин, при этом гемостаза в области воздействия не происходит. При инъекционном введении под кожу концентрированного раствора иммерсионного агента оптическое просветление кожи происходит в течение 3-4 мин, а затем прозрачность ткани постепенно снижается, при этом наблюдается гемостаз.
5. Впервые показана возможность оптического просветления костной ткани при использовании в качестве оптических иммерсионных агентов глицерина и пропиленгликоля.
6. Показано, что под действием 40%-ного раствора глюкозы в течение 90 мин оптическая глубина детектирования структурных элементов ткани скелетной мышцы *in vitro* с помощью оптической когерентной томографии увеличивается в 2.4 раза.
7. Разработан эффективный безинъекционный метод введения иммерсионных оптических агентов в кожу с использованием мультимодального подхода: комбинации ДМСО как химического энхансера и низкочастотного ультразвукового воздействия. При этом эффективность оптического просветления кожи *in vivo* практически совпадает с эффективностью оптического просветления кожи, лишённой рогового слоя эпидермиса.
8. Показано, что контраст визуализации тканевых неоднородностей с помощью оптической когерентной томографии может быть увеличен как при снижении рассеяния окружающей биоткани, так и при увеличении рассеяния самой неоднородности. В частности, получено увеличение контраста ОКТ-изображения волокон мышечной ткани в 4 раза при снижении рассеяния с помощью 40%-ного раствора глюкозы. А также получено увеличение контраста ОКТ-изображения сосудов печени в 1.5 раза через 24 часа после внутривенного введения суспензии золотых наночастиц за счёт повышения рассеяния сосудов.
9. Экспериментально исследован транспорт фотосенсибилизатора метиленового синего, растворенного в физиологическом растворе NaCl, в патологически измененной слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи носа человека *in vitro* с помощью спектроскопии обратного рассеяния. В процессе проникновения наблюдалась димеризация красителя и смещение полос поглощения в длинноволновую область спектра по сравнению с полосами поглощения водного раствора красителя.
10. Экспериментально исследован транспорт индоцианинового зелёного, растворённого в воде и водных растворах спиртов (глицерина, пропиленгликоля и этанола), в дерме с помощью спектроскопии обратного рассеяния. В процессе проникновения обнаружено значительное (до 40 нм) смещение в коротковолновую

область спектра максимума поглощения ИЗ в дерме и образование агрегированной формы красителя при использовании в качестве растворителей 50%-ных водных растворов глицерина и пропиленгликоля. При диффузии индоцианинового зелёного, растворённого в этаноле, подобного смещения и агрегации не наблюдалось.

11. Впервые получены значения эффективного коэффициента диффузии исследуемых красителей в слизистой оболочке и дерме при использовании в качестве растворителей растворов спиртов, которые позволяют оценить скорость окрашивания биотканей.

12. Исследована диффузия метиленового синего и индоцианинового зелёного через эпидермальный барьер. Получены значения эффективных коэффициентов диффузии исследуемых красителей при использовании в качестве растворителя 40%-ного водного раствора этанола.

13. Разработан эффективный метод доставки лекарственных препаратов в кожу с помощью фракционной оптотермической микроабляции рогового слоя эпидермиса.

14. Разработан эффективный метод доставки нано- и микрочастиц в глубокие слои дермы и создание там долговременного депо с помощью фракционной лазерной микроабляции.

15. Экспериментально показано, что абляция рогового слоя эпидермиса вызывает увеличение светорассеяния дермы, что снижает эффективность оптического просветления кожи иммерсионными агентами сразу после абляции по сравнению с просветлением кожи без предварительной абляции.

Список литературы, цитируемой в автореферате:

1. Тучин В.В. Оптика биологических тканей: методы рассеяния света в медицинской диагностике. - М.: Физматлит, 2011. – 812 с.
2. Tuchin V.V. Optical Clearing of Tissues and Blood. Bellingham: SPIE Press, 2006. – 254 p.
3. Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V.V. Recent progress in tissue optical clearing // Laser & Photonics Reviews. - 2013. - Vol. 7. - № 5. - P. 732-757.
4. Usacheva M.N., Teichert M.C., Usachev Y.M., Sievert C.E., Biel M.A. Interaction of the photobactericides methylene blue and toluidine blue with a fluorophore in *Pseudomonas aeruginosa* cells // Lasers Surg. Med. - 2008. - Vol. 40. - P. 55-61.
5. Yanina I.Yu., Tuchin V.V., Navolokin N.A., Matveeva O.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Altshuler G.B. Fat tissue histological study at indocyanine green-mediated photothermal/photodynamic treatment of the skin in vivo // J. Biomed. Opt. – 2012. - Vol. 17. - №5. – 058002.
6. Alander J.T., Kaartinen I., Laakso A., Patila T., Spillmann T., Tuchin V.V., Venermo M., Valisuo P. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery // International Journal of Biomedical Imaging. – 2012. – Vol. – 2012. - 940585.

7. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Altshuler G.B., Tuchin V.V. *In vitro* and *in vivo* study of dye diffusion into the human skin and hair follicles // J. Biomed. Opt. - 2002. - Vol. 7. - № 3. - P. 471-477.
8. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V., Chikina E.E., Knyazev A.B., Mareev O.V. Optical properties of human maxillary sinus mucosa and estimation of methylene blue diffusion coefficient in the tissue // Proc. SPIE. - 2005. Vol. 5771. - P. 316-327.
9. Bachhav Y.G., Summer S., Heinrich A., Bragagna T., Böhler C., Kalia Y.N. Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin // J. Control. Release. - 2010. - Vol. 146. - P. 31-36.
10. Aljuffali I.A., Lin C.-H., Fang J.-Y. Skin ablation by physical techniques for enhancing dermal/transdermal drug delivery // J. Drug Del. Sci. Tech. - 2014. - Vol. 24. - № 3. - P. 277-287.
11. Cevc G., Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal//J. Control. Release. - 2010. - Vol. 141. - P. 277-299.
12. Lin C.-H., Aljuffali I.A., Fang J.-Y. Lasers as an approach for promoting drug delivery via skin // Expert Opinion on Drug Delivery. - 2014. - Vol. 11. - № 4. - P. 599-614.
13. Parker S. The use of diffuse laser photonic energy and indocyanine green photosensitiser as an adjunct to periodontal therapy // Br. Dental J. - 2013. - Vol. 215. - № 4. - P. 167-171.
14. Park K.Y., Kim J.Y., Hyun M.Y., Oh W.J., Jeong S.Y., Han T.Y., Ahn J.Y., Kim B.J., Kim M.N. 1,213 cases of treatment of facial acne using indocyanine green and intense pulsed light in asian skin // BioMed Research International. - 2015. - Vol. 2015. - P. 596161.
15. Richardson D.S., Lichtman J.W. Clarifying tissue clearing // Cell. - 2015. - Vol. 162. - P. 246-257.
16. Treweek J.B., Chan K.Y., Flytzanis N.C., Yang B., Deverman B.E., Greenbaum A., Lignell A., Xiao C., Cai L., Ladinsky M.S., Bjorkman P.J., Fowlkes C.C., Gradinaru V. Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping // Nature Protocols. - 2015. - Vol. 10. - № 11. - P. 1860-1896.
17. Susaki E.A., Ueda H.R. Whole-body and whole-organ clearing and imaging techniques with single-cell resolution: toward organism-level systems biology in mammals // Cell Chemical Biology. - 2016. - Vol. 23. - № 1. - P. 137-157.
18. Optical coherence tomography. Technology and Applications. Second Edition / Eds. Drexler W., Fujimoto J.G. - Springer International Publishing Switzerland, 2015.
19. Wang R.K., Tuchin V.V. Optical coherence tomography. Light scattering and imaging enhancement / Ed. V.V. Tuchin. - New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2013 - p. 665-742.

20. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, CIOMS&ICLAS. – Режим доступа: <http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-the-new-international-guiding-principles-for-biomedical-researchinvolving-animals>.
21. Galanzha E.I., Tuchin V.V., Solovieva A.V., Stepanova T.V., Luo Q., Cheng H. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents // J. Phys. D: Appl. Phys. - 2003. - Vol. 36. - № 14. - P. 1739-1746.
22. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. - Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2010 - 488 с.
23. Mourant J.R., Johnson T.M., Los G., Bigio I.J. Non-invasive measurement of chemotherapy drug concentrations in tissue: preliminary demonstrations of *in vivo* measurements // Phys. Med. Biol. - 1999. - Vol. 44. - P. 1397-1417.
24. Dolotov L.E., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V., Utz S.R., Altshuler G.B., Yaroslavsky I.V. Design and evaluation of a novel portable erythema-melanin-meter // Lasers Surg. Med. - 2004. - Vol. 34. - P. 127-135.
25. Mitragotri S. *In situ* determination of partition and diffusion coefficients in the lipid bilayers of stratum corneum // Pharm. Res. - 2000. - Vol. 17. - № 8. - P. 1026-1029.
26. Банди Б. Методы оптимизации. - М.: Радио и связь, 1988. - 128 с.
27. El-Domyati M., Abd-El-Raheem T., Abdel-Wahab H., Medhat W., Hosam W., El-Fakahany H., Al Anwer M. Fractional versus ablative erbium:yttrium-aluminum-garnet laser resurfacing for facial rejuvenation: an objective evaluation // J. Am. Acad. Dermatol. – 2013. – Vol. 68. P. - 103-112.
28. Tanzi E.L., Alster T.S. Single-pass carbon dioxide versus multiple-pass Er:YAG laser skin resurfacing: a comparison of postoperative wound healing and side effect rates // Dermatol. Surg. – 2003. – Vol. 29. – P. 80-84.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации (*):

По материалам диссертации опубликовано 55 научных работ, в том числе 37 научных статей, включённых в перечень рекомендованных ВАК, и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, 14 статей в сборниках трудов конференций, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, и 4 главы в монографиях.

Научные статьи в ведущих рецензируемых журналах, включённых в перечень ВАК:

1. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Кочубей В.И., Лакодина Н.А., Тучин В.В. Определение коэффициента диффузии глюкозы в склере глаза человека // Биофизика. - 2003. – Т. 48.- № 2. – С. 309-313.
2. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Кочубей В.И., Тучин В.В. Оптическое просветление твердой мозговой оболочки человека // Оптика и спектроскопия. – 2005. – Т. 98. - № 3. – С. 515–521.

3. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление склеры глаза *in vivo* под действием глюкозы // Квантовая электроника. – 2006. – Т. 36. – № 12. – С. 1119-1124.
4. Genina E.A., Bashkatov A.N., Chikina E.E., Knyazev A.V., Mareev O.V., Tuchin V.V. Methylene Blue Mediated Laser Therapy of Maxillary Sinusitis // Laser Physics. - 2006. - Vol. 16. - № 7. – С. 1128-1133.
5. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Чикина Е.Э., Тучин В.В. Диффузия метиленового синего в слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи человека // Биофизика. - 2007. – Т. 52. - № 6. – С. 1104-1111.
6. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В., Г.Б. Альтшулер, Ярославский И.В. Исследование возможности повышения эффективности лазерного удаления татуировок за счет оптического просветления кожи // Квантовая электроника. - 2008. – Т. 38. - № 6. – С. 580-587.
7. Генина Э.А., Федосов И.В., Башкатов А.Н., Зимняков Д.А., Альтшулер Г.Б., Тучин В.В., Визуализация распределения меланина и индоцианина зеленого внутри биоткани // Квантовая электроника. - 2008. – Т. 38. - № 3. – С. 263-268.
8. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования *ex vivo* и *in vivo* // Оптика и спектроскопия. - 2010. - Т. 109. - № 2. - С. 1312-1319.
9. Генина Э.А., Киндер С.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Контрастирование изображений в оптической когерентной томографии печени с помощью наночастиц // Изв. Сарат. ун-та, Новая сер., Сер. Физика. - 2011. - Т. 11. - Вып. 2. - С. 10-14.
10. Генина Э.А., Долотов Л.Е., Башкатов А.Н., Терентюк Г.С., Маслякова Г.Н., Зубкина Е.А., Тучин В.В., Ярославский И.В., Альтшулер Г.Б. Фракционная лазерная микроабляция кожи для усиления ее проницаемости для наночастиц // Квантовая электроника. – 2011. - Т. 41. - № 5. – С. 396-401.
11. Терентюк Г.С., Генина Э.А., Башкатов А.Н., Рыжова М.В., Цыганова Н.А., Чумаков Д.С., Хлебцов Б.Н., Сазонов А.А., Долотов Л.Е., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г., Иноземцева О.А. Использование фракционной лазерной микроабляции и ультразвука для улучшения доставки наночастиц золота в кожу *in vivo* // Квантовая электроника. - 2012. – Т. 42. - № 6. С. 471-477.
12. Генина Э.А., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Визуализация распределения наночастиц золота в тканях печени *ex vivo* и *in vitro* методом оптической когерентной томографии // Квантовая электроника. - 2012. – Т. 42. - № 6. – С. 478-483.
13. Орлова А.С., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Колбенив И.О., Каменских И.Д., Каменских Т.Г., Тучин В.В. Влияние 40% раствора глюкозы на структуру роговицы человека // Изв. Сарат. ун-та, Новая сер., Сер. Физика. - 2014. - Т. 14. - Вып. 1. - С. 11-19.

14. Генина Э.А., Терентюк Г.С., Башкатов А.Н., Михеева Н.А., Колесникова Е.А., Баско М.В., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г., Тучин В.В. Сравнительное исследование физического, химического и мультимодального подходов к усилению транспорта наночастиц в коже с модельным дерматитом // Российские нанотехнологии. - 2014. - Т. 9. - № 9-10. - С. 87-95.
15. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Исследование диффузии фотодинамического красителя индоцианинового зеленого в коже с помощью спектроскопии обратного рассеяния // Квантовая электроника. - 2014. - Т. 44. - № 7. - С. 689-695.
16. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Каменских Т.Г., Тучин В.В. Оптическое просветление склеры глаза человека водным 30%-раствором глюкозы // Изв. Сарат. ун-та, Новая сер., Сер. Физика. - 2015. - Т. 15. - Вып. 3. - С. 18-24.
17. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Исследование влияния этанола на трансэпидермальный транспорт индоцианинового зелёного с помощью спектроскопии обратного рассеяния // Изв. Сарат. ун-та, Новая сер., Сер. Физика. - 2016. - Т. 16. - Вып. 2. - С. 91-96.
18. Генина Э.А., Долотов Л.Е., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Фракционная лазерная микроабляция кожи: Повышение эффективности чрескожной доставки частиц // Квантовая электроника. - 2016. - Т. 46. - № 6. - С. 502-509.
19. Тучина Д.К., Генин В.Д., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление тканей кожи *ex vivo* под действием полиэтиленгликоля // Оптика и спектроскопия. - 2016. - Т. 120. - № 1. - С. 36-45.
20. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Козинцева М.Д., Тучин В.В. ОКТ-исследование оптического просветления мышечной ткани *in vitro* с помощью 40% раствора глюкозы // Оптика и спектроскопия. - 2016. - Т. 120. - № 1. - С. 27-35.
21. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Семякина-Глушковская О.В., Тучин В.В. Оптическое просветление черепной кости многокомпонентными иммерсионными растворами и визуализация церебрального венозного кровотока // Изв. Сарат. ун-та, Новая сер., Сер. Физика. - 2017. - Т. 17. - Вып. 2. - С. 96-108.
22. Генина Э.А., Ксенофонтова Н.С., Башкатов А.Н., Терентюк Г.С., Тучин В.В. Исследование влияния абляции эпидермиса на эффективность оптического просветления кожи *in vivo* // Квантовая электроника. - 2017. - Т. 47. - № 6. - С. 561-566.

Научные статьи в ведущих рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus:

23. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Tuchin V.V. Glucose and mannitol diffusion in human dura mater // Biophysical Journal. - 2003. - Vol. 85. - № 5. - P. 3310-3318.

24. Tuchin V.V., Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., Altshuler G.B. A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: photodynamic and photothermolysis treatment // *Lasers Surg. Med.* - 2003. - Vol. 33. – P. 296-310.
25. Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., Tuchin V.V., Altshuler G.B. Low-intensity Indocyanine green - laser phototherapy of acne vulgaris: Pilot study // *J. Biomed. Opt.* – 2004. - Vol. 9. - № 4. – P. 828-834.
26. Bashkatov A.N., Genina E.A., Gavrilova A.A., Pravdin A.B., Tabatadze D., Childs J., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B., Tuchin V.V. What exactly causes increase in skin transparency: water replacement or dehydration? // *Lasers Surg. Med.* - 2006. - Vol. 38. – Suppl. 18. - P. 84.
27. Genina E.A., Bashkatov A.N., Korobko A.A., Zubkova E.A., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // *J. Biomed. Opt.* – 2008. - Vol. 13. - № 2. – 021102.
28. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Optical clearing of cranial bone // *Advances in Optical Technologies.* – 2008. – Vol. - 2008. – 267867.
29. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Effect of ethanol on the transport of methylene blue through stratum corneum // *Medical Laser Application.* – 2008. - Vol. 23. - № 1. – P. 31-38.
30. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V., Simonenko G.V., Sherstneva V.N., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Comparative treatment of acne vulgaris using Palomar Lux appliqué technique and direct intralesional injection // *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* – 2009. - Vol. 2. - № 3. – P. 279-287.
31. Altshuler G.B., Yaroslavsky I.V., Tabatadze D., Belikov A.V., Dierickx C.C., Genina E.A., Dolotov L.E., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Laser injection of molecules and particles // *Lasers Surg. Med.* - 2010. - Vol. 42. - Suppl. 22. - P. 4.
32. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Review of Medical Devices.* - 2010. - Vol. 7. - № 6. - P. 825-842.
33. Genina E.A., Titorenko V.A., Simonenko G.V., Bashkatov A.N., Shub G.M., Lepilin A.B., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Phototherapy of gingivitis: Pilot clinical study // *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* - 2011. – Vol. 4. - № 4. – P. 437-446.
34. 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 Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* - 2012. - Vol. 18. – № 3. – P. 1244-1259.
35. Genina E.A., Bashkatov A.N., Dolotov L.E., Maslyakova G.N., Kochubey V.I., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B., Tuchin V.V. Transcutaneous delivery of micro- and nanoparticles with laser microporation // *J. Biomed. Opt.* - 2013. - Vol. 18. - № 11. – 111406.

36. Genina E.A., Bashkatov A.N., Kolesnikova E.A., Basco M.V., Terentyuk G.S., Tuchin V.V. Optical coherence tomography monitoring of enhanced skin optical clearing in rats in vivo // J. Biomed. Opt. - 2014.- Vol. 19. - № 2. – 021109.
37. Genina E.A. Svenskaya Yu.I., Yanina I.Yu., Dolotov L.E., Bashkatov A.N., Navolokin N.A., Terentyuk G.S., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Gorin D.A., Tuchin V.V., and Sukhorukov G.B. Optical monitoring of transcutaneous delivery of composite microparticles in vivo // Biomedical Optics Express. - 2016. - Vol. 7. - № 6. - P. 2082-2087.

Статьи в сборниках трудов международных конференций, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus:

1. Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Simonenko G.V., Sinichkin Yu.P., Proshina Yu.M., Razumikhina N.A. Optics of living tissues with controlled scattering properties // Proceedings of SPIE. - 1999. - Vol. 3863. - P. 10-21.
2. Bashkatov A.N., Tuchin V.V., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Lakodina N.A., Kochubey V.I. The human sclera dynamic spectra: in-vitro and in-vivo measurements // Proceedings of SPIE. - 1999. - Vol. 3591. - P. 311-319.
3. Genina E.A., Bashkatov A.N., Lakodina N.A., Murikhina S.A., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. Diffusion of glucose solution through fibrous tissues: in vitro optical and weight measurements // Proceedings of SPIE. - 2000. - Vol. 4001. - P. 255-261.
4. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Sinichkin Yu.P., Korobov A.A., Lakodina N.A., Tuchin V.V. In vitro study of control of human dura mater optical properties by acting of osmotical liquids // Proceedings of SPIE. - 2000. - Vol. 4162. - P. 182-188.
5. Bashkatov A.N., Genina E.A., Korovina I.V., Sinichkin Yu.P., Novikova O.V., Tuchin V.V. In vivo and in vitro study of control of rat skin optical properties by action of 40%-glucose solution // Proceedings of SPIE. - 2001. - Vol. 4241. - P. 223-230.
6. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V. The influence of glycerol on the transport of light in the skin // Proceedings of SPIE. - 2002. - Vol. 4623. - P. 144-152.
7. Lakodina N.A., Bashkatov A.N., Genina E.A., Simonenko G.V., Tuchin V.V. Reflectance, transmittance, and polarization of light interacting with immersed tissue: in vitro and in vivo study // Proceedings of SPIE. - 2003. - Vol. 4829. - P. 1032-1033.
8. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Optical clearing of human cranial bone by administration of immersion agents // Proceedings of SPIE. - 2006. - Vol. 6163. – 616311.
9. Bashkatov A.N., Korolevich A.N., Stolnitz M.M., Genina E.A., Tuchin V.V., Sinichkin Y.P., Dubina N.S., Vecherinski S.I., Belsley M.S. Optical clearing of skin tissue produced by application of glucose solution: in vivo study // Proceedings of SPIE. - 2006. - Vol. 6163. – 616313.

10. Genina E.A., Kuzmina M.Yu., Pankov S.S., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. In vitro study of Indocyanine Green solution interaction with skin // Proceedings of SPIE. – 2007. – Vol. 6535. - 65351H.
11. Genina E.A., Bashkatov A.N., Gavrilova A.A., Pravdin A.B., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Skin optical clearing for improvement of laser tattoo removal // Proceedings of SPIE. - 2007. - Vol. 6734. – 673419.
12. Genina E.A., Korobko A.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. Investigation of skin water loss and glycerol delivery through stratum corneum // Proceedings of SPIE. – 2007. – Vol. 6535. - 65351G.
13. Kozina A.M., Genina E.A., Terentyuk G.S., Terentyuk A.G., Bashkatov A.N., Tuchin V.V., Khlebtsov B.N. The development of skin immersion clearing method for increasing of laser exposure efficiency on subcutaneous objects // Proceedings of SPIE. - 2012. - Vol. 8427. – 842726.
14. Genin V.D., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Measurement of diffusion coefficient of propylene glycol in skin tissue // Proceedings of SPIE. - 2015. – Vol. 9448. - 9448 0E.

Главы в монографиях

1. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Glucose-induced optical clearing effects in tissues and blood. In Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / edited by V.V. Tuchin. – Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009. - P. 657-692.
2. Genina E.A., Bashkatov A.N., Larin K.V., Tuchin V.V. Light-tissue interaction at optical clearing. In Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology / edited by F.S. Pavone. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. - P. 115-164.
3. Genina E.A., Larin K.V., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Glucose and other metabolites sensing in skin. In Handbook of Biophotonics, vol. 2: Photonics for Health Care / edited by J. Popp, V. Tuchin, A. Chiou, and S.H. Heinemann. – Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. - P. 835-854.
4. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. Optical clearing of tissues: benefits for biology, medical diagnostics and phototherapy. In Handbook on Optical Biomedical Diagnostics, Vol. 2: Methods / edited by V.V. Tuchin. - 2nd ed.- Bellingham: SPIE Press 2nd ed., 2016. - P. 565-937.

Подписано в печать 10.07.2017.
Формат 60x90 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Объём 2.5 печ.л. Тираж 100 экз. Заказ № 101-Т

Типография СГУ
г. Саратов, ул. Б. Казачья 112а
тел.: (845-2) 27-33-85