

На правах рукописи



Швачкина Марина Евгеньевна

**Исследование влияния оптического иммерсионного
просветления на фотосшивание коллагена тканей**

03.01.02 — Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Саратов — 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель: **Правдин Александр Борисович**
кандидат химических наук,
доцент кафедры оптики и биофотоники

Официальные оппоненты: **Игнатьева Наталия Юрьевна**
доктор химических наук,
МГУ имени М.В. Ломоносова,
доцент кафедры физической химии

Ушакова Ольга Валерьевна
кандидат физико-математических наук, доцент,
СГТУ имени Гагарина Ю.А.,
доцент кафедры «Системотехника и управление
в технических системах»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Саратовский государственный
медицинский университет
имени В. И. Разумовского»
Минздрава России, г. Саратов

Защита состоится «25» января 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.18 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Университетская, 40, III корпус, ауд. 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: <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-18/kandidatskaya-dissertaciya-shvachkinoy-marinu>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физ.-мат. наук, доцент



Генина
Элина Алексеевна

Общая характеристика работы

Актуальность темы

Одним из основных заболеваний, приводящих к нарушению зрения, является близорукость, серьезной формой которой является прогрессирующая миопия, характеризующаяся растяжением склеры. Перспективным методом лечения прогрессирующей миопии, не предполагающим внедрение инородных тел в организм, является коррекция механических свойств склеры задней поверхности глазного яблока посредством фотовоздействия, приводящего к образованию дополнительных ковалентных связей между молекулами коллагена внутри склеры (фотосшивание/кросслинкинг коллагена), с использованием рибофлавина (RF) в качестве сенсibiliзатора и ультрафиолетового излучения. Фотосшивание склерального коллагена повышает жесткость склеры и улучшает ее механические свойства, способствуя стабилизации патологического процесса (замедляя или даже останавливая патологические изменения) при прогрессирующей миопии, что доказано в экспериментах на мелких лабораторных животных [1–4]. В то же время в литературе [2] отмечается недостаточная эффективность существующих методик кроссликинга коллагена для склеры человека, что в большой степени связано с сильным рассеянием ультрафиолетового (УФ) излучения биотканью, ослабляющим эффективность фотовоздействия в толще ткани. Увеличить глубину проникновения УФ-излучения в биоткань позволяет метод иммерсионного оптического просветления [5,6]. Нанесение иммерсионных агентов (ИА) на склеру перед процедурой фотосшивания может увеличить эффективность данного метода и уменьшить требуемую дозу УФ-облучения, делая процедуру более безопасной. Эксперименты показывают [7], что сенсibiliзированное фотовоздействие в условиях оптического иммерсионного просветления приводит к большему увеличению жесткости образцов склеры, однако, механизм явления не был исследован. В литературе, в частности в [6], было отмечено уменьшение площади образца соединительной ткани под действием ИА. В работе [8] на образцах дермы показано, что химическое сшивание ткани в дегидратированном состоянии способствует сохранению контрактированного состояния ткани после ее регидратации. В свете этого можно ожидать, что воздействие гиперосмотического ИА на заднюю поверхность склеры приведет к сокращению площади ткани, то есть к купированию ее растяжения, обусловленного миопией, а фиксация такого сжатого состояния путем образования сшивок позволит не только замедлить развитие миопии, но и уменьшить уже развившееся к моменту воздействия растяжение (изменение фор-

мы) задней стенки, и тем самым осуществить не только стабилизирующий, но и терапевтический эффект.

Основной **целью** данной работы является изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на результаты процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания (RF/UV CXL) коллагенсодержащих тканей.

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

Физические, и в том числе механические, свойства коллагенсодержащих тканей сильно зависят от степени гидратации ткани [9], которая может существенно изменяться при проведении фотосшивания. Это делает актуальной разработку эффективной методики, позволяющей оценивать содержание воды в ткани на разных этапах процедуры RF/UV CXL. Кроме того, существует потребность в простых и надежных методах, позволяющих оценивать изменение состава жидкостей в ткани в процессе ее иммерсионного просветления и при вымывании ИА из ткани.

Анализ морфологических изменений в ткани, сопровождающих и определяющих изменение механических и геометрических свойств ткани, подвергнутой RF/UV CXL в условиях иммерсионного просветления, и выбор условий эксперимента по измерению механических характеристик образца ткани требуют достаточно полной информации о морфологии образцов. Механические свойства таких тканей, как склера и дерма, являются анизотропными – они зависят от направления приложения силы. Это связано с наличием направлений преимущественной ориентации коллагеновых волокон на участках макроскопических размеров. Склере характерна значительная вариация направления преимущественной ориентации коллагеновых волокон и степени их ориентационной упорядоченности. Для характеристики организации тканей, таких как склера, на макроуровне используются карты ориентации коллагеновых волокон, показывающие преимущественное направление и степень их ориентации в разных областях. В известных методах картографирования коллагенового матрикса биотканей используются метод малоуглового рассеяния света, метод рассеяния рентгеновских лучей, нелинейная микроскопия и поляризационная микроскопия. Методы поляризации-

онной микроскопии являются наиболее простыми и доступными и обеспечивают наибольшую площадь захвата данных. При проведении механических измерений требуется информация об ориентации коллагеновых волокон для образца ткани (полоски склеральной оболочки) как целого, при его толщине от 400 до 2000 мкм. При такой толщине образец является непрозрачным из-за сильного рассеяния, вследствие чего не подходит для поляризационного картографирования. Для проведения поляризационного картографирования, прозрачность ткани должна быть увеличена, что может быть достигнуто с помощью техники иммерсионного просветления. В связи с этим актуальной является задача подбора условий эксперимента, в том числе, условий иммерсионного просветления, при которых поляризационное картографирование могло бы быть использовано для количественной характеристики морфологии коллагенового матрикса склеры.

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

1. Исследование влияния иммерсионных агентов на коллимированное пропускание склеры в диапазоне длин волн 360–370 нм.
2. Проведение оценочных биомеханических измерений, направленных на изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания.
3. Исследование возможностей применения для контроля изменений биохимического состава, происходящих в ткани при фотосшивании, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции.
4. Разработка надежной методики оценки содержания воды в ткани для характеристики образцов коллагенсодержащей ткани на разных этапах процесса рибофлавин/УФ фотосшивания.
5. Разработка надежной методики, позволяющей оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации.
6. Исследование влияния степени гидратации ткани во время УФ-обработки на свойства фотосшитой ткани после ее регидратации.
7. Оценка возможности использования поляризационно-микроскопического картографирования для картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах тканей, таких как склера, при использовании техники иммерсионного просветления.

Научная новизна: В данной работе впервые экспериментально выявлена тенденция к большему увеличению жесткости образца склеры при проведении рибофлавин/УФ фотосшивания в условиях предварительного им-

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

Научно-практическая значимость работы

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

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

Положения:

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

Результаты:

1. Разработанная методика определения содержания воды в ткани по величине среднего группового показателя преломления ткани.
2. Разработанная методика ОКТ-мониторинга изменения содержания воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках.

Достоверность полученных результатов обуславливается использованием апробированных методик измерений, адекватностью используемых теоретических моделей, воспроизводимостью результатов экспериментов, а также согласием результатов с данными, полученными другими исследователями.

Апробация работы. Основные научные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике "Saratov Fall Meeting" (Саратов, 2015-2020); XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 2015); Всероссийская молодежная научная школа-конференция "Практическая биофизика – 2015" (Саратов, 2015); VI Всероссийская неделя науки с международным участием "Week of Russian science" (WeRuS-2017) (Саратов, 2017); XX международная конференция молодых ученых и специалистов "Оптика-2017" (Санкт-Петербург, 2017); XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, 2018).

Гранты научных фондов. Исследования, вошедшие в данную диссертационную работу, были поддержаны следующими научными фондами: РФФИ, проект № 17-00-00275 (17-00-00272), 2018-2020гг.; РФФИ, проект №17-32-50190, 2018г.; Министерство образования и науки РФ, проект № 3.1586.2017/4.6, 2017-2019гг.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке задач исследования. Им самостоятельно проведены экспериментальные работы

и обработка полученных данных, вывод аналитических выражений, компьютерные расчеты и анализ полученных результатов.

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

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

Содержание работы

В **главе 1** представлен краткий обзор литературы по строению и свойствам коллагенсодержащих тканей, таких как склера, роговица и сухожилие (ряд экспериментов по фотосшиванию в данной работе выполнено на коллагеновых пучках сухожилий, которые более просты по структуре и более удобны в экспериментальном плане, чем склера), рассмотрены известные методы кросслинкинга коллагена и методы оценки их эффективности, а также основные факторы, определяющие эффективность RF/UV CXL. Отмечены основные работы, описывающие применение RF/UV CXL для укрепления роговицы и исследующие возможности применения данного метода для модификации механических свойств склеры. Особое внимание уделено химическим моделям образования сшивок при RF/UV CXL. Также дан краткий обзор работ, посвященных применению к склере техники иммерсионного просветления.

В **главе 2** представлены результаты оценочных оптических и биомеханических измерений, направленных на изучение влияния предварительного иммерсионного просветления ткани на эффективность RF/UV CXL. В разделе 2.1 представлены результаты оценки эффективности различных ИА в просветлении склеры в диапазоне длин волн 360–370 нм. Эффективность просветляющего действия ИА оценивалась по степени увеличения коллимированного пропускания образцов при просветлении. Эксперименты проводились на образцах склеры кролика. Для измерений образцы (полоски деэпителизированной ткани размером 0,5×1 см²) целиком погружались в кювету, заполненную ИА. Спектры коллимированного пропускания образцов в спектральном диапазоне 300–400 нм измерялись с помощью спектрометра UV-VIS USB4000 (Ocean Optics, США). В качестве ИА использовались водные растворы глицерина с объемным содержанием глицерина 85%, 63,8% и 42,5%, водные растворы глюкозы концентрацией 54% и 40% по массе и полиэтилен-

гликоль ПЭГ-300. Эксперименты показали, что из рассмотренных ИА наибольшее просветляющее действие на склере в УФ области оказывает 85% раствор глицерина (рис. 1). В биомеханических исследованиях, описанных далее в данной главе, использовался именно этот просветляющий агент.

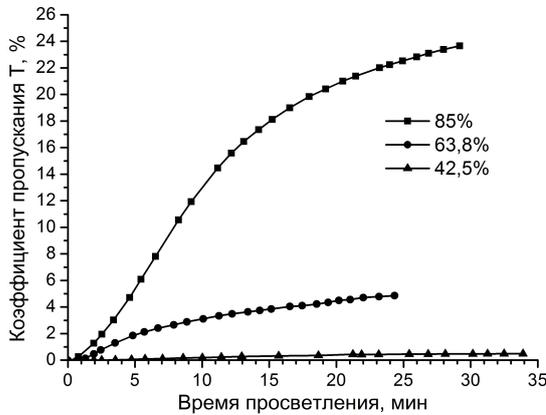


Рисунок 1. Зависимость коэффициента пропускания на длине волны 370 нм образцов склеры кролика от времени выдерживания образца в растворе глицерина при различных концентрациях глицерина в растворе.

В разделе 2.2.1 представлены результаты измерений, показывающие, что механические свойства образцов (склера свиньи), подвергнутых иммерсионному просветлению в 85% растворе глицерина, восстанавливаются до нативного уровня при их регидратации в физиологическом растворе в течение суток. Механические свойства образцов в этом и последующих экспериментах оценивались по измеренным зависимостям «механическое напряжение – относительное удлинение», полученным с помощью динамического механического анализатора DMA Q800. В разделе 2.2.2 сравниваются механические свойства образцов склеры, подвергнутых RF/UV CXL с оптическим просветлением и без него. В соответствии с методикой, описанной в [2], для сравнения использовались значения напряжения, обеспечивающие относительное удлинение 8%, которые были получены после 5 циклов растяжения образца. Для повышения вероятности того, что сравниваемые образцы будут обладать похожими морфологическими свойствами, проводилось попарное сравнение механических свойств образцов, вырезанных из одной и той же области склеры. Сначала приведены оценки изменения жесткости склеры после обычной процедуры RF/UV CXL. Рассчитывалось отношение значений напряжения при 8% относительном удлинении после 5 растяжений для образца, подвергнутого RF/UV CXL, и для его парного необработанного образца. Среднее значение этого отношения для исследуемых 8 пар образцов составило $1,43 \pm 0,36$ ($P = 0,9$), что свидетельствует о том, что RF/UV CXL приводит к увеличению жесткости ткани. Далее представлены результаты попарного сравнения механических свойств образцов склеры, подвергнутых RF/UV CXL с предварительным оптическим просветлением, и образцов склеры, подвергнутых фотосшиванию без просветления. Значения напряжения, соответствующего 8% относительному удлинению, для образцов, фотосшитых с просветлением,

оказались в среднем в $1,33 \pm 0,32$ ($P = 0,7$; 3 пары образцов) больше, чем для образцов, фотосшитых без просветления, что позволяет утверждать, что RF/UV CXL склеры в просветленном состоянии с вероятностью 0,7 (при условии нормального распределения среднего) приводит к большему увеличению жесткости по сравнению с обычным RF/UV CXL.

В главе 3 представлены результаты исследований возможностей применения для мониторинга изменений, происходящих в ткани на разных стадиях процесса фотосшивания, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники (backward second harmonic generation, BSHG) и двухфотонной флуоресценции (two photon fluorescence, TPF) с временным разрешением (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) и продемонстрировано, что FLIM-микроскопия является очень информативной в плане оценки интенсивности протекания фотохимических реакций при фотосшивании склеры. Одним из основных достоинств нелинейной микроскопии является возможность проведения измерений *in vivo*. Измерения проводились с помощью двухфотонного томографа JenLab MPTflex в национальном исследовательском Томском государственном университете на образцах склеры свиньи. В качестве ИА использовался 88% водный раствор глицерина. Время выдерживания образцов в ИА составляло 20 минут (время достижения образцом минимального объема). УФ-обработка проводилась в течение 30 минут. В экспериментах на образцах склеры в нативном состоянии было установлено, что для приповерхностных областей стромы (с глубиной залегания до 80 мкм; условия эксперимента не позволяли осуществлять зондирование на больших глубинах) в условиях двухфотонного возбуждения флуоресценции излучением с длиной волны 760 нм функции затухания флуоресценции могут сильно различаться в зависимости от локализации зондируемого участка, однако средние нормированные функции затухания флуоресценции (НФЗФ), полученные усреднением по нескольким участкам на одной глубине, приблизительно одинаковы для разных глубин и разных образцов. В результате обработки данных для 7 образцов нативной склеры (45–90 областей с разных глубин для каждого образца) были найдены три базисные функции $f_{si}(t)$ ($i=1,2,3$), в виде линейной комбинации которых можно с высокой точностью представить любую из полученных локальных НФЗФ нативной склеры. В измерениях на слое 0,1% водного раствора RF была найдена средняя НФЗФ рибофлавина $f_r(t)$. При рассмотрении образцов склеры, пропитанных RF, для оценки локальной концентрации RF использовалась следующая декомпозиция измеренных локальных НФЗФ ($f_{\text{exp}}(t)$):

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

Коэффициенты a_{s1} , a_{s2} , a_{s3} и a_r рассчитывались из условия минимума

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

где t_i – значение временной переменной, соответствующее i -ой точке кривой затухания, N – число временных отсчетов на кривой затухания. Параметры $A_s = (a_{s1} + a_{s2} + a_{s3}) / (a_{s1} + a_{s2} + a_{s3} + a_r)$ и $A_r = a_r / (a_{s1} + a_{s2} + a_{s3} + a_r)$ рассматривались как меры относительного вклада в суммарную флуоресценцию образца флуоресценции эндогенных флуорофоров и RF, соответственно. Функция $f_r(t)$ является значительно более пологой по сравнению с функциями $f_{si}(t)$ ($i=1,2,3$), что дает возможность выделить вклад флуоресценции RF с хорошей точностью. Для оценки относительного содержания RF в ткани на заданной глубине использовался следующий параметр:

$$R_r = \langle A_r / A_s \rangle_S,$$

где скобки $\langle \dots \rangle_S$ обозначают усреднение по площади (по участкам, расположенным на одной глубине) при масштабах области усреднения порядка 100 мкм². При условии, что ткань является достаточно однородной в том смысле, что для протяженных слоев ткани средняя по площади концентрация эндогенных флуорофоров мало зависит от глубины залегания слоя, изменения параметра R_r пропорциональны изменениям концентрации RF. Выдерживание образцов склеры в растворе глицерина для оптического просветления не приводило к изменению формы НФЗФ. При этом наблюдалось уменьшение флуоресценции RF с приповерхностных областей (значения R_r для этих областей после просветления оказались меньшими, чем до просветления, см. рис. 2(а)). Вероятно, это связано с частичным вымыванием RF из приповерхностных областей при дегидратации ткани под действием ИА. Для образцов, подвергавшихся УФ-обработке в условиях оптического просветления, УФ-обработка приводила к более чем двукратному уменьшению R_r (рис. 2(а)), что происходило за счет превращения большей части RF в лейкофлавин – нефлуоресцирующий продукт фотолиза RF и фотохимических реакций, происходящих при фотосшивании. В случаях же, когда фотосшивание проводилось без оптического просветления, существенных изменений свойств флуоресценции образцов, обусловленных УФ-обработкой, не наблюдалось (рис. 2(б)). Это позволяет утверждать, что иммерсионное оптическое просветление способно значительно увеличить интенсивность протекания процесса фотосшивания в толще стромы склеры.

Одним из факторов, подлежащем учету при проведении биомеханических исследований, в том числе, связанных с использованием фотосшивания, является степень гидратации ткани. В разделах 4.1 и 4.2 главы 4

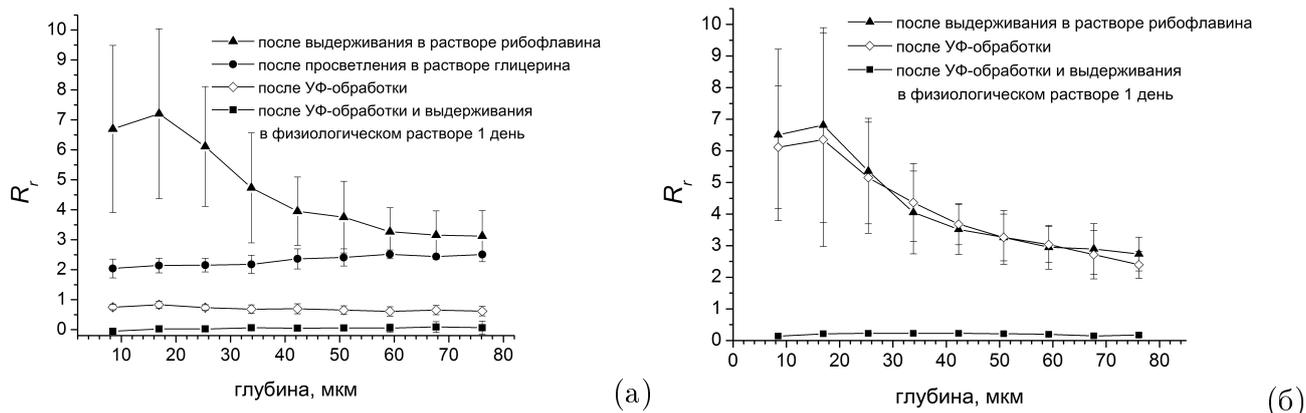


Рисунок 2. Зависимости R_t от глубины для образцов склеры на разных стадиях процесса фотосшивания с оптическим просветлением (а) и без оптического просветления (б).

представляется оригинальная методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления (ГПП) ткани с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ). В результате экспериментов по дегидратации образцов вторичных сухожильных пучков хвоста крысы на воздухе и в водных растворах ПЭГ-300 с последующей регидратацией образцов в физиологическом растворе (0,9% водный раствор хлорида натрия) была получена калибровочная кривая, позволяющая оценивать содержание воды по измеренному значению среднего ГПП ткани на длине волны 930 нм. ОКТ-мониторинг осуществлялся с помощью томографа ThorLabs-ОСР930SR (центральная длина волны зондирующего излучения – 930 нм, ширина полосы – 100 нм). Используемый метод ОКТ-мониторинга описан в деталях в работах [10,11]. Для оценки среднего ГПП ткани по данным ОКТ был использован общий подход [12], предполагающий определение ГПП по смещению изображения отражающей поверхности, расположенной за образцом, относительно его положения в отсутствие образца и по ГПП среды, окружающей образец. Была проведена прямая экспериментальная проверка применимости правила Гладстона-Даля для оценки содержания воды в коллагенсодержащей ткани при ее дегидратации и регидратации. Измерения показали, что зависимость среднего ГПП ткани, n_t , на длине волны 930 нм от объемного содержания воды в ткани, c_w , может считаться линейной по меньшей мере в диапазоне значений объемного содержания воды от 0,2 до 0,8 и что зависимость n_t от c_w в указанном диапазоне может быть представлена следующей эмпирической формулой $n_t = (1 - c_w)1,594 + n_w c_w$, где n_w – ГПП воды на длине волны 930 нм (рис. 3). Приведенная эмпирическая формула соответствует правилу Гладстона-Даля, если принять средний ГПП ткани в сухом состоянии равным 1,594. Под сухим состоянием ткани в данном исследовании подразумевалось состояние, которое достигается в результате выдерживания образца при температуре 105°C до достижения постоянной массы. Показано,

что полученная калибровочная кривая хорошо согласуется с экспериментальными данными по зависимости среднего ГПП стромы роговицы от степени ее гидратации, представленными в работе [13].

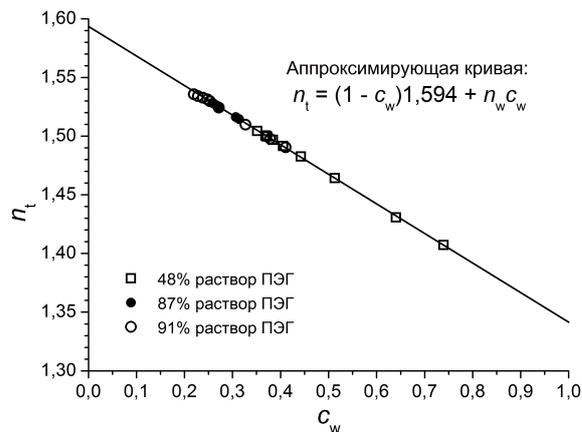


Рисунок 3. Зависимость среднего группового показателя преломления ткани на длине волны 930 нм (n_t) от объемного содержания воды (c_w) в долях. Точки (c_w, n_t) получены при дегидратации образцов в водных растворах ПЭГ разной концентрации.

В последующих разделах **главы 4** представляются результаты экспериментального исследования взаимодействия с коллагенсодержащими тканями различных ИА: водных растворов глицерина разной концентрации (с объемным содержанием глицерина 80,3%, 58,1%, 41,2% и 20,6%), водного раствора пропиленгликоля объемной концентрацией 89%, водного раствора глюкозы с массовым содержанием глюкозы 40%, Омнипак-300 и водного раствора ПЭГ-300 с объемным содержанием ПЭГ 91%. Как известно, ключевыми процессами, определяющими ход иммерсионного просветления, являются осмотическая дегидратация ткани под действием ИА и диффузия ИА в ткань. Одной из задач проведенного исследования было получение временных зависимостей концентрации воды и ИА в ткани для образцов, просветляемых в различных ИА. Исследования проводились на образцах вторичных коллагеновых пучков сухожилий хвоста крысы. Структура и состав первичных коллагеновых пучков (волокон), из которых состоят вторичные сухожильные пучки, аналогичны структуре и составу коллагеновых волокон склеры. По упаковке фибрилл в волокнах и распределению диаметров фибрилл сухожилия также схожи со склерой. ОКТ-мониторинг изменений характеристик образцов осуществлялся в соответствии с методом [10,11]. Одним из основных достоинств разработанной методики эксперимента является то, что она позволяет производить мониторинг непрерывно, без переустановок образца и нарушения естественного хода диффузионных процессов. Наряду со средним ГПП ткани, измерялся и ее средний групповой показатель двулучепреломления (ГПД) – в данных измерениях ОКТ-система была настроена так, чтобы плоскость преимущественной поляризации зондирующего излучения составляла 45° относительно оси исследуемого коллагенового пучка, что позволяло наблюдать на ОКТ-изображении образца интерференционные полосы, обусловленные двулучепреломлением ткани, по которым рассчитывался ГПД.

После оптического просветления исследуемого коллагенового пучка посредством мультиспектрального поляризационного картографирования измерялся средний фазовый показатель двулучепреломления ткани на разных длинах волн видимого диапазона и оценивалась степень однородности ориентации коллагеновых волокон в образце (при измерениях исследуемый пучок находился в слегка натянутом состоянии, что, как показало поляризационное картирование, обеспечивало близкую к однородной ориентацию волокон в пучке). При оценке текущего содержания воды и ИА в ткани ткань с проникшим в нее ИА рассматривалась как трехкомпонентная система, состоящая из «сухой» составляющей ткани (совокупность веществ, остающихся в ткани в сухом состоянии), воды и ИА (или его неводной составляющей). Расчет текущих концентраций компонентов осуществляется в предположении о применимости к этой системе правила Гладстона-Даля по измеренным для данного момента времени значениям среднего ГПП ткани n_t и коэффициента изменения объема ткани k_s , рассчитываемого как отношение площади поперечного сечения исследуемого коллагенового пучка в текущий момент времени к площади его поперечного сечения в исходном состоянии (концы пучка в ходе эксперимента были жестко закреплены, и длина пучка в ходе эксперимента не изменялась). Также в этих расчетах используются значения содержания воды в образце в его исходном состоянии и ГПП ИА. Групповые показатели преломления ИА рассчитывались по спектрам их фазового показателя преломления, которые были получены с помощью многоволнового рефрактометра Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония). В качестве примера на рисунках 4 и 5 представлены результаты измерений для образцов сухожильных коллагеновых пучков, подвергавшихся иммерсионному просветлению в водных растворах глицерина разной концентрации. На рис. 4 показаны измеренные значения k_s и n_t для разных моментов времени с момента воздействия на образец ИА, а на рис. 5 – рассчитанные по ним текущие значения объемной концентрации глицерина и воды в ткани. Как и во многих других случаях [5], в данных примерах можно условно разделить процесс взаимодействия ткани с ИА на две основные стадии. Первая стадия, начальная, – это стадия быстрой дегидратации, на которой доминирующую роль играет обезвоживание ткани за счет осмотического действия ИА. На этой стадии происходит уменьшение объема ткани за счет выхода из нее воды. Вторая стадия – это стадия набухания ткани. Доминирующую роль на этой стадии играет диффузия ИА в ткань. В нашем случае время окончания этапа быстрой дегидратации ткани может быть определено как время достижения образцом минимального объема. Для всех рассматриваемых ИА были оценены степень гидратации ткани и количество ИА, диффундировавшего в ткань, к моменту окончания

стадии быстрой дегидратации. Как видно из рис. 4 и 5, для растворов глицерина эти характеристики, а также скорость диффузии ИА в ткань на стадии набухания сильно зависят от концентрации глицерина в ИА. Представлены данные, показывающие, что значения объемного содержания воды и глицерина, достигаемые в момент окончания этапа быстрой дегидратации ткани, слабо зависят от начального содержания воды в образце при значениях исходного объемного содержания воды в диапазоне от 64% до 71%.

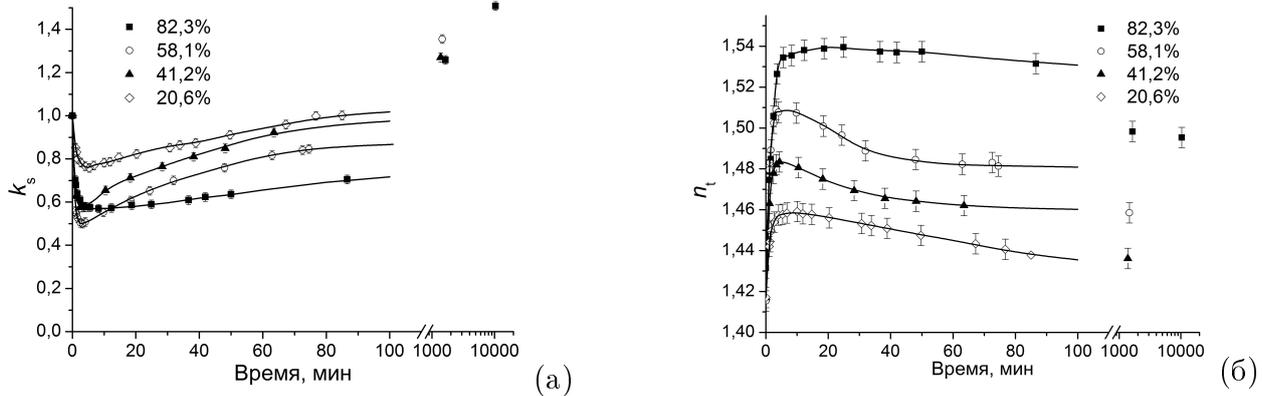


Рисунок 4. Типичные временные зависимости коэффициентов изменения объема k_s (а) и среднего группового показателя преломления n_t (б) сухожильных пучков при их оптическом просветлении в водных растворах глицерина с разной концентрацией.

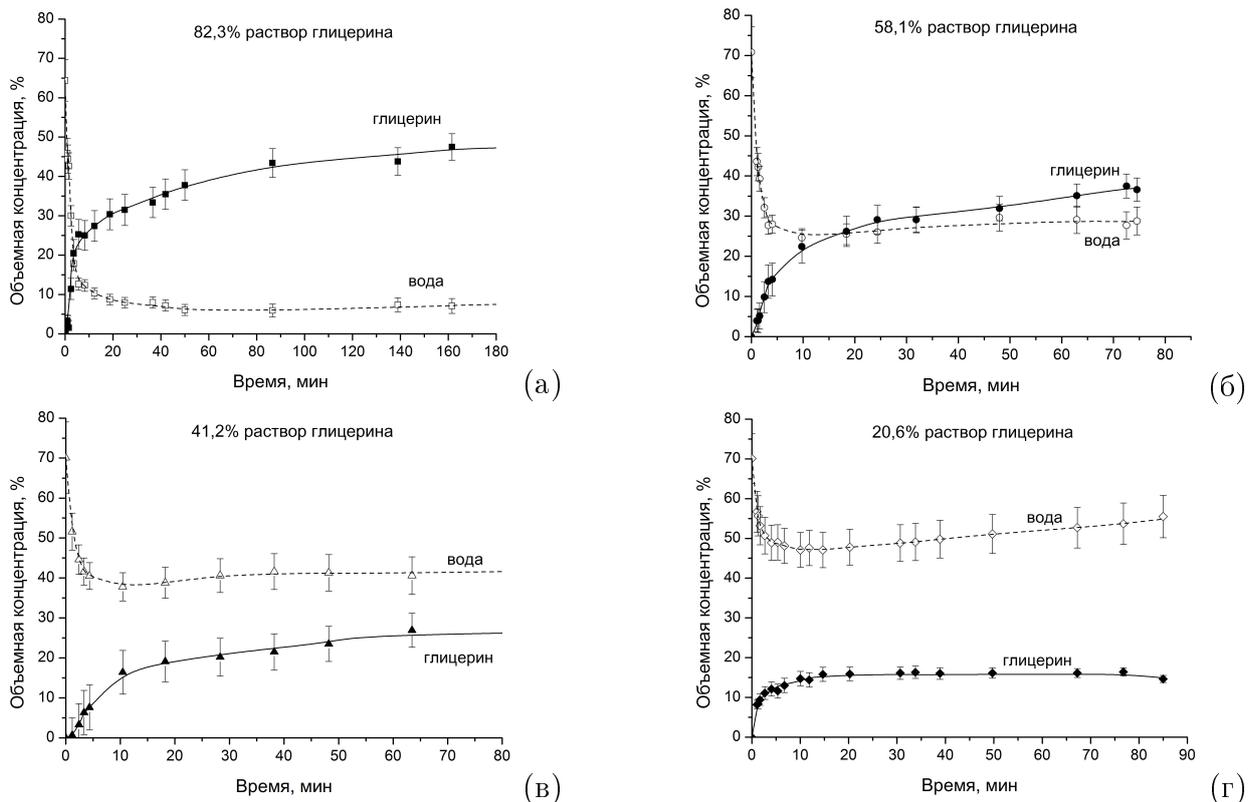


Рисунок 5. Изменение объемной концентрации глицерина и воды в ткани с момента погружения образца в иммерсионную жидкость для образцов, просветлявшихся в 82,3% (а), 58,1% (б), 41,2% (в) и 20,6% растворах глицерина (г).

Также в **главе 4** представлены результаты исследования изменений характеристик двулучепреломления коллагеновых волокон при дегидрата-

ции и регидратации ткани, а также происходящих при взаимодействии ткани с ИА. В разделе 4.4 данные по изменению объема, ГПП и ГПД ткани, полученные при дегидратации и регидратации образцов, используются для оценки распределения воды между фибриллами и интерстициальной жидкостью при разных уровнях гидратации ткани и показано хорошее соответствие полученных оценок с литературными данными [14], полученными с помощью рентгеноструктурного анализа.

Под действием ИА, применяемых для оптического просветления, обычно происходит частичная дегидратация ткани. Известно, что химический кросслинкинг ткани в дегидратированном состоянии способен приводить к существенному уменьшению объема ткани после ее регидратации до насыщенного состояния по сравнению с исходным, то есть к фиксации контрактированного состояния ткани (КСТ) [8]. В этом случае в насыщенном регидратированном состоянии ткань, подвергнутая кроссликингу, содержит меньшее количество воды, чем в исходном состоянии. **Глава 5** посвящена исследованию возможности фиксирования КСТ при осуществлении RF/UV SXL ткани в частично дегидратированном состоянии. Исследования проводились *in vitro* на образцах вторичных сухожильных пучков хвоста крысы. До УФ-обработки образцы выдерживались в ИА до момента достижения образцом минимального объема (до окончания стадии быстрой дегидратации). В качестве ИА использовались 37%, 58,5%, 87% водные растворы ПЭГ-300, содержащие 0,1% RF. УФ-облучению подвергался сегмент пучка длиной 4,5 мм; другой, зеркально расположенный, сегмент пучка облучению не подвергался и рассматривался как контрольный. После УФ-обработки образцы регидратировались в физиологическом растворе в течение 2 часов. Контроль геометрии сухожильных пучков и содержания воды в ткани, c_w , в облученной и необлученной областях пучка осуществлялся с помощью ОКТ в соответствии с методиками, описанными в главе 4. Объемная степень гидратации образца, H_V , рассчитывалась по полученным значениям объемной доли воды по формуле $H_V = c_w / (1 - c_w)$. Для оценки степени контракции ткани после фотосшивания с предварительным просветлением рассчитывался коэффициент фотоиндуцированной контракции (K), определяемый как отношение объемов в исходном состоянии равновеликих областей в облученной и необлученной областях образца. Эксперименты показали, что фиксирование КСТ может происходить, если фотосшивание осуществляется при уровнях объемной гидратации ткани (H_{V-deh}) меньше 0,8 (рис. 6). Наблюдалась тенденция к увеличению вероятности фиксирования КСТ и степени результирующей контракции ткани с уменьшением степени гидратации ткани во время УФ-обработки. Когда УФ-обработка ткани осуществлялась при уровнях объемной гидрата-

ции меньше 0,5, фиксирование КСТ наблюдалось во всех случаях (9 образцов), при этом результирующая контракция ткани составляла 8–15% (рис. 6). Компьютерное моделирование показало, что при уровнях гидратации ткани $H_{V-deh} < 0,8$ коллагеновые фибриллы в волокнах плотно соприкасаются друг с другом, что создает условия для образования межфибриллярных сшивок (сшивок между молекулами коллагена соседних фибрилл). Следствием образования таких сшивок, а также внутрифибриллярных сшивок у поверхности дегидратированных фибрилл, не позволяющих фибриллам восстановить свой первоначальный объем при регидратации, по всей видимости, и является наблюдаемая фиксация КСТ.

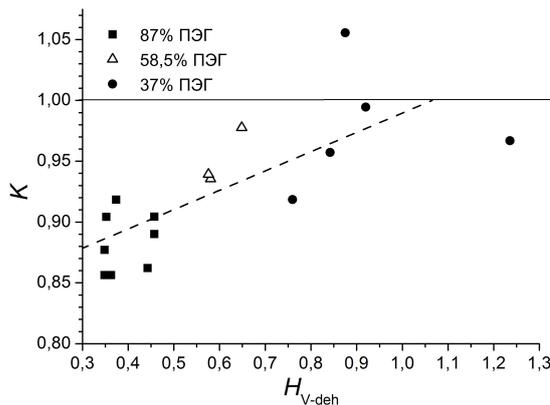


Рисунок 6. Зависимость коэффициента фотоиндуцированной контракции (K) от степени гидратации ткани во время УФ облучения (H_{V-deh}).

В **приложении** представлены дополнительные рисунки и таблицы, а также детально описан используемый в данной работе метод поляризационного картографирования коллагенсодержащих тканей и рассмотрены возможности и особенности применения для картирования структуры толстых образцов биотканей, в частности склеры, техники иммерсионного просветления.

В **Заключении** приведены основные результаты работы. Они состоят в следующем:

1. Исследовано влияние различных ИА, 85%, 63,8% и 42,5% водные растворы глицерина, 40% и 54% водные растворы глюкозы и ПЭГ-300, на пропускание света склерой в УФ-А области. Показано, что использование 85% раствора глицерина приводит к наибольшему увеличению коллимированного пропускания склеры в диапазоне длин волн 360–370 нм.
2. Проведены оценочные биомеханические измерения, направленные на изучения влияния предварительного иммерсионного просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания склеры; отмечена тенденция к увеличению жесткости образца фотосшитого в условиях предварительного иммерсионного просветления.
3. Разработан и апробирован метод оценки вклада флуоресценции рибофлавина и флуоресцирующих продуктов фотолиза рибофлавина в регистрируемый сигнал флуоресценции склеры, подвергнутой рибофла-

вин/УФ фотосшиванию, основанный на декомпозиции функции затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям, соответствующим различным компонентам системы.

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

Список литературы

1. Wollensak G., Iomdina E. // Acta Ophthalmol. – 2009. – Vol. 87, no. 2. – P. 193–198.
2. Y. Zhang et al. // BioMed Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–5.
3. Е. Н. Иомдина и др. // Вестник офтальмологии. – 2016. – Т. 132, № 6. – С. 49–58.
4. М. М. Бикбов и др. // Офтальмология. – 2016. – Т. 12, № 4. – С. 4–8.
5. Тучин В. В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2013. – С. 812.
6. Д. К. Тучина и др. // Опт. и спектр. – 2016. – Т. 120, № 1. – С. 36–45.
7. Швачкина М. Е., Правдин А. Б. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 37–41.
8. Y. Tanaka et al. // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, no. 28. – P. 6764–6772.
9. Natami-Marbini H., Rahimi A. // Curr. Eye Res. – 2016. – Vol. 41, no. 5. – P. 616–622.
10. М. Е. Shvachkina et al. // J. Biomed. Photon. & Eng. – 2018. – Vol. 4, no. 1. – P. 010302.
11. М. Е. Швачкина и др. // Опт. и спектр. – 2019. – Т. 127, № 2. – С. 337–346.
12. X. J. Wang et al. // J. Biomed. Opt. – 1996. – Vol. 1, no. 2. – P. 212–217.
13. Y. L. Kim et al. // Phys. Med. Biol. – 2004. – Vol. 49, no. 5. – P. 859–868.
14. S. Hayes et al. // J. R. Soc. Interface. – 2017. – Vol. 14, no. 131. – P. 20170062.

Основные публикации автора по теме диссертации

Статьи в российских журналах, входящих в список ВАК:

1. **Швачкина М. Е., Правдин А. Б.** Об использовании оптического просветления при укреплении склеры методом фотосшивания коллагена // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2015. – Т. 15, №4. – С.37–41.
2. Оценка возможностей трансмиссионного поляризационного картографирования для характеристики макроструктуры склеры / **М. Е. Швачкина**, А. Б. Правдин, Д. А. Тихонов и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. – Т.13, №2. – С. 435–441.
3. Мониторинг процесса иммерсионного оптического просветления коллагеновых волокон с помощью оптической когерентной томографии / **М. Е. Швачкина**, Д. Д. Яковлев, Е. Н. Лазарева и др. // Оптика и спектроскопия. – 2019. – Т.127, №2 – С.337–346.
4. **Швачкина М. Е.** О возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2019. – Т.19, №3 – С.210–222.

Статьи в зарубежных изданиях, индексируемых реферативными базами "Web of Science", "Scopus":

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