

На правах рукописи



Янина Ирина Юрьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В
СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО И СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Специальность 03.01.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники ФГБОУ ВПО Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского» Министерства образования и науки РФ и на кафедре медбиофизики имени проф. В.Д. Зернова ГБОУ ВПО Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского Министерства здравоохранения РФ

- Научные руководители:** Заслуженный деятель науки РФ, доктор физико-математических наук, профессор Тучин Валерий Викторович; Почетный работник высшего профессионального образования РФ, кандидат физико-математических наук, доцент Дубровский Валерий Александрович
- Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор Бриль Григорий Ефимович ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского Минздрава РФ
кандидат физико-математических наук, Скапцов Александр Александрович образовательно-научный институт наноструктур и биосистем СГУ
- Ведущая организация:** ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт кардиологии» Минздрава РФ, г. Саратов

Защита состоится 6 сентября 2013 года в 17:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.05 в Саратовском государственном университете им. Н. Г. Чернышевского по адресу: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского государственного университета.

Автореферат разослан 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н., профессор



В. Л. Дербов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Настоящая работа относится к фотобиологии животной клетки, она посвящена экспериментальному изучению влияния световых потоков видимого и ближнего ИК диапазонов на клетки сенсibilизированной жировой ткани *in vitro* и *in vivo*.

Исследования последних десятилетий позволили по-новому взглянуть на причины и механизмы развития многих заболеваний, прежде всего таких социально значимых, как атеросклероз и ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, сахарный диабет 2-го типа, болезни печени, ортопедических заболеваний, ряд онкологических заболеваний (липома, липосаркома и т.п.). Получены убедительные доказательства взаимосвязи этих заболеваний с избыточным накоплением жира в организме, т. е. с ожирением. В этой связи возрос интерес к изучению функций жировой ткани и их роли в норме и при патологии, а также к разработке способов удаления избыточных отложений. В настоящее время общепризнано, что жировая ткань играет большую роль в метаболической регуляции как энергетического равновесия в организме, так и сосудистого гомеостаза. Знание физиологических функций жировой ткани необходимо не только для понимания патогенеза ожирения и связанных с ним заболеваний, но и для их эффективной профилактики и лечения.

Ожирение, как правило, лечится диетой, физическими упражнениями и уменьшением слоя подкожной жировой клетчатки с помощью пластической хирургии, липосакции, ультразвуковой и лазерной терапии. Благодаря быстрому темпу жизни современного общества, многим трудно поддерживать здоровую диету и регулярно заниматься спортом, чтобы предотвратить ожирение. В связи с этим предпочтение отдается инвазивным процедурам. Инвазивные процедуры являются объектом риска для пациента из-за инфекций, кровотечения, риска здоровью при анестезии и других после - хирургических осложнений.

В настоящее время ведутся активные поиски новых оптических технологий, позволяющих селективно разрушать жировую ткань. Одним из самых простых способов физического воздействия на жировые клетки, является гипертермия. Известны методы селективного нагрева подкожной жировой ткани оптическим, в том числе лазерным, излучением. В ряде случаев, оптический нагрев активизирует кровообращение и биологические рецепторы, в зону воздействия привлекаются макрофаги, которые утилизируют разрушенные жировые клетки. Создание новых лазерных источников стимулирует интерес к исследованию взаимосвязей

между параметрами лазерного излучения и оптическими свойствами жировой ткани.

Анализ литературы показывает, что действие света на сенсibilизированную ткань, в том числе и жировую, является вполне актуальной задачей как с точки зрения теоретической (фундаментальная «фотобиология животной клетки»), так и прикладной, например, фототерапия. Особый интерес вызывают задачи подбора типа фотосенсibilизатора для различных биотканей, изучение механизмов действия.

Из краткого обзора, представленного в диссертации, следует, что изучение воздействия источников оптического излучения на сенсibilизированную жировую ткань является малоизученным и перспективным для приложений направлением в фотомедицине. Существует ряд нерешенных проблем, в том числе малоисследованны спектральные характеристики сенсibilизированной жировой ткани, особенности их изменения в зависимости от параметров излучения, несмотря на то, что знание этих данных является принципиально важным для обеспечения хорошо контролируемой послойной лазерной деструкции ткани при лечении ожирения и целлюлита. В литературе отсутствуют рекомендации и критерии для выбора параметров источников излучения и самих источников, способных вызвать щадящую послойную деструкцию сенсibilизированной подкожной жировой клетчатки без её полного разрушения.

Недостаточно внимание исследователей уделено изучению теплового воздействия на сенсibilизированную жировую ткань, а также комбинированному фотодинамическому и тепловому влиянию на сенсibilизированную жировую ткань. В литературе нет данных о влиянии фотодинамического действия на подкожную жировую клетчатку *in vivo*, не известны пути гибели адипоцитов в данном случае.

Поэтому актуальным является поиск методов минимально инвазивных процедур, в результате которых клетки гибели по апоптотическому сценарию, без воспалительного ответа. Также, до конца нераскрыты механизмы действия лазерного и светодиодного излучения на сенсibilизированную жировую ткань.

Решение вышеописанных проблем и вопросов является актуальным и определило цель настоящей диссертационной работы.

Цель диссертационной работы состояла в экспериментальном исследовании биофизических процессов при воздействии оптического излучения на клетки жировой ткани при ее сенсibilизации красителями.

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

- исследования спектральных характеристик подкожной жировой клетчатки, красителей различной концентрации и сенсibilизированной этими красителями жировой ткани как до, так и после облучения биообъекта,
- подбор источника излучения для обеспечения эффективного действия на биоткань в видимой и ИК областях спектра с учетом используемого красителя,
- исследование воздействия лазерного и светодиодного излучения на сенсibilизированную жировую ткань
- исследование теплового и комбинированного (фотодинамическое / тепловое) воздействия на жировую ткань,
- исследование кинетики изменения оптических свойств жировой ткани, сенсibilизированной красителями, *in vitro* как результат фотодинамического действия, а также определение биофизических механизмов взаимодействия химических агентов со структурными компонентами жировой ткани,
- исследование механизмов, приводящих к липолизу адипоцитов, с помощью цифровой микроскопии и оптической когерентной томографии, на основе анализа изображений сенсibilизированной и облученной светом жировой ткани,
- анализ патоморфологических изменений в подкожной жировой клетчатке при фотодинамическом воздействии на кожу крыс *in vivo*

Научная новизна работы:

- исследована кинетика изменения оптических свойств сенсibilизированной красителями жировой ткани *in vitro* как результат фотодинамического/фотохимического действия. Впервые экспериментально продемонстрирован эффект оптического иммерсионного просветления сенсibilизированной жировой ткани в результате фотодинамического воздействия.
- впервые на основе анализа изображений жировой ткани, сенсibilизированной красителями, при фотодинамическом воздействии *in vitro* выдвинута гипотеза о механизме, вызывающем липолиз адипоцитов. На основе оптической цифровой микроскопии впервые зарегистрированы небольшие образования в проекции мембраны жировой клетки, наличие

которых при фотодинамическом действии на ткань статистически достоверно связаны с ее просветлением.

- впервые показано увеличение эффективности процесса просветления сенсibilизированной жировой ткани после облучения при нагреве в пределах температур от 40 до 50 °С.
- впервые сделан анализ патоморфологических изменений подкожной жировой клетчатки при фотодинамическом воздействии на кожу крыс *in vivo*.

Научная и практическая значимость работы

Результаты диссертационной работы развивают и дополняют теоретические и экспериментальные основы фотобиологии животной клетки и служат для разработки эффективных методов коррекции жировых отложений, борьбы с опухолевыми новообразованиями, для выяснения механизмов клеточной гибели (апоптоз или некроз). Результаты работы открывают новые возможности для изучения мембраны жировых клеток.

В работе предложен оптический метод фотодинамического/ теплового воздействия на жировые клетки, способный обеспечить минимально инвазивное уменьшение объема подкожной жировой ткани путем контролируемого липолиза.

Основные результаты и положения, выносимые на защиту:

1. Анализ кинетики изменения оптического пропускания слоя жировой ткани, сенсibilизированной водно-спиртовым раствором бриллиантового зеленого при концентрации 6 мг/мл, при фотовоздействии на длинах волн 442 и 597 нм с общей плотностью мощности излучения не превышающей 75 мВт/см² позволил предложить метод «мягкой» редукции объема ткани путем липолиза жировых клеток без их существенной деструкции.
2. Вблизи поверхности мембран клеток жировой ткани впервые экспериментально зарегистрированы небольшие образования (структуры), размерами от 2 до 8 мкм, которые характеризуются изменяющимся во времени оптическим пропусканием и трактуются как капельки внутриклеточной жидкости, секретлируемой через образованные поры в мембране. Исследовано количество и размеры этих образований (структур) в зависимости от условий фотовоздействия. Среднее количество наблюдаемых «образований» на одну клетку составляло 5-10 без фотовоздействия и 15 – 30 при облучении сенсibilизированных водно-спиртовым раствором бриллиантового зеленого жировых клеток.

Коэффициент корреляции между временными зависимостями пропускания T и количества "образований" (пор) составил 0.87.

3. Экспериментальное обнаружение и исследование оптического просветления при фотовоздействии на сенсibilизированную жировую ткань, что связывается с повышением оптической однородности ткани за счет иммерсии компонентов ткани продуктами липолиза.

4. При *in vivo* подкожном введении водно-спиртовых растворов бриллиантового зеленого и индоцианинового зеленого и чрезкожном облучении излучением диодной лампы (625 нм, плотность энергии 720 Дж/см²) и диодного лазера (808 нм, плотность энергии 960 Дж/см²) у экспериментальных животных в коже, жировой и мышечной ткани развиваются выраженные изменения, в том числе в подкожной жировой клетчатке наблюдается распространенная деструкция клеток.

Личный вклад автора диссертации

В ходе работы над диссертационным исследованием соискателем принято участие в разработке экспериментальной установки, выявлены ее метрологические характеристики и проведена калибровка; разработана методика проведения экспериментов, состоящая в подборе концентраций красителя, доз облучения, способных вызвать значительные изменения в биоткани; постановка экспериментов, проведенных совместно с сотрудниками Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского и Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского; статистическая, компьютерная обработка экспериментальных результатов; участие в обсуждении экспериментальных результатов и трактовки наблюдаемых эффектов.

Разработка и отладка установки осуществлялась с помощью профессора кафедры оптики и биофотоники СГУ, д.ф.-м.н. Симоненко Г.В. Спектральные измерения были проведены совместно с профессором той же кафедры, д.ф.-м.н. Кочубеем В.И. Эксперименты на оптическом когерентном томографе проводились совместно с аспиранткой Труниной Н.А. Эксперименты и обсуждение результатов по фотодинамическому действию на подкожную жировую клетчатку *in vivo* проведены совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии СГМУ (зав. кафедрой, д.м.н., проф. Маслякова Г.Н.). Формулировка темы диссертационной работы, постановка исследовательских задач, обсуждение результатов, объяснение наблюдаемых явлений, подготовка статей к публикации и обсуждение текста

диссертационной работы, ее основных положений и выводов, осуществлялись Тучиным В.В. – руководителем диссертационной работы от СГУ. Под руководством Дубровского В.А. были выявлены метрологические характеристики и проведена калибровка экспериментальной установки, предложены методики проведения экспериментов и обработки экспериментальных результатов по ряду задач. Он также принял участие в обсуждении экспериментальных результатов, трактовке наблюдаемых явлений, подготовке совместных статей и обсуждении текста диссертационной работы.

Достоверность полученных в работе результатов и выводов обусловлена адекватностью используемых методов измерения, обработки и анализа экспериментальных данных. Результаты проведенных исследований подвергались статистической обработке. Все оригинальные результаты воспроизводятся при повторении экспериментов.

Апробация работы.

Основные результаты работы докладывались на Международной молодежной научной школе по оптике, лазерной физике и биофизике (2008-2012), на межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Молодежь и наука, итоги и перспективы» (2008, 2009), на международной конференции Optics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine III (San Jose, USA, 2009), на научно-практической конференции студентов и молодых учёных Саратовского медицинского университета. «Молодые ученые – здравоохранению региона» (2010-2011), на III Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика - 2010», на международных конференциях Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics, Mechanisms for Low-Light Therapy VI (San Francisco, California, USA) (2010-2013), Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions V (Munich, Germany) (2011, 2013), на студенческой научно-практической конференции в рамках первой Всероссийской недели науки с международным участием, посвященной дню российской науки «Молодые ученые – здравоохранению» (2012), на международной конференции Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care (Brussels, Belgium) (2012), на Российско-китайском семинаре по биофотонике и биомедицинской оптике 2012 и на международной конференции 1st International Biophotonics Meeting in Israel (Tel Aviv, Israel) (2012).

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в 35 печатных работах, из которых 17 научных статей – в рецензируемых журналах из списка ВАК, 18 статей в трудах международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения и списка цитируемой литературы, состоящего из 191 наименований. Диссертация изложена на 178 страницах, содержит 76 рисунков, 10 таблиц, 7 формул.

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского и на кафедре медбиофизики им. проф. В.Д. Зернова Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы, изложена цель и задачи исследования, кратко изложено содержание работы и сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** получены спектральные характеристики подкожной жировой ткани, индоцианинового зеленого и бриллиантового зеленого. Измерены спектры поглощения жировой ткани человека при ее сенсibilизации красителями.

На рисунках 1 и 2 приведены истинные (восстановленные с учетом рассеяния света) спектры поглощения жировой ткани $D_{\text{п}}(\lambda)$, окрашенной индоцианиновым зеленым (ИЗ) и истинные спектры поглощения жировой ткани $D_{\text{п}}(\lambda)$, окрашенной бриллиантовым зеленым (БЗ), соответственно.

На основе анализа измеренных спектров поглощения можно утверждать о сдвиге положения максимумов полосы поглощения фотосенсибилизаторов в жировой ткани по сравнению с их спектрами в растворах. Сдвиг обусловлен взаимодействием молекул ИЗ и БЗ с коллагеном и другими белковыми молекулами, входящими в основном в состав межклеточного матрикса (септа, диаметр волокон порядка 50-200 нм). Анализируя спектры красителей в растворах и в тканях, важно отметить также изменение формы спектров. Пик молекул-мономеров спектра поглощения значительно снизился и стал сравнимым с пиком – молекул-димеров. На основе полученных спектров были рассчитаны относительные концентрации красителей в ткани.

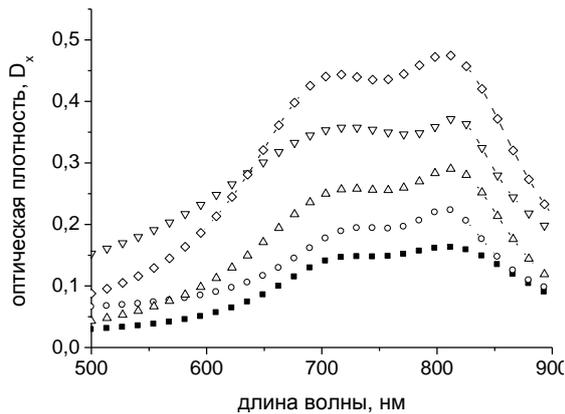


Рисунок 1 - Истинные спектры поглощения подкожной жировой ткани, окрашенной растворами ИЗ концентрации $1.6 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ■, $1.8 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ○, $3.2 \cdot 10^{-4}$ моль/л - Δ, $6.45 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ▽ и $12.9 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ◇, D_x – оптическая плотность раствора ИЗ в ткани.

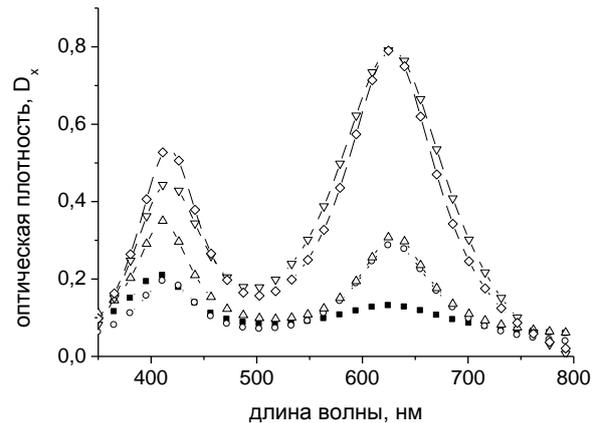


Рисунок 2 - Истинные спектры поглощения подкожной жировой ткани, окрашенной растворами БЗ концентраций $1.05 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ■, $1.16 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ○, $1.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л - Δ, $1.68 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ▽ и $2.1 \cdot 10^{-4}$ моль/л - ◇, D_x – оптическая плотность раствора БЗ в ткани.

Во второй главе рассмотрены материалы и методы исследования, представлены красители, источники излучения, описана подготовка образцов, микроскоп, камера, дана методика обработки изображений.

Материалом исследования служила подкожная жировая ткань. Проводились серии экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*. В серии экспериментов *in vitro* использовалась подкожная жировая ткань, извлеченная после хирургической пластической операции. Для микроскопических исследований необходимо было изготовление тонких срезов жировой ткани толщиной порядка 100-150 мкм, только при таких толщинах было возможно получение изображений в проходящем свете. Исследуемая ткань предварительно замораживалась в течение суток. В серии исследований с помощью оптического когерентного томографа приготавливались срезы жировой ткани толщиной порядка 200-600 мкм.

В *in vivo* исследованиях для изготовления гистологического препарата были подготовлены образцы кожи вместе с подкожной жировой клетчаткой, изъятые у лабораторных животных. В дальнейшем после фиксации и окраски, изготавливались срезы размерами 5 мкм, подвергавшиеся патоморфологическому анализу.

Основными методами исследования были цифровая микроскопия, спектроскопия, оптическая когерентная томография и гистологический патоморфологический анализ препаратов.

В работе использовали красители трифенилметанового (бриллиантовый зеленый) и цианинового (индоцианиновый зеленый) рядов. Красители трифенилметанового ряда широко применяют в аналитической химии, фотохимии и др. областях. Индоцианиновый зеленый успешно используется в фототермической иммунной терапии рака, а также для фотодинамической и фототермической терапии воспалительных заболеваний, например, угревой сыпи и инфекционных дерматитов.

Выбор источников излучения обусловлен попаданием максимумов спектров излучения в полуширину спектров поглощения красителей.

Подготовка образцов для экспериментов *in vitro*:

Приготовленный образец (срез) замороженной жировой ткани человека размещался на предметном стекле микроскопа, окрашивался выбранным красителем в течение 10 мин. Затем образец термостабилизировался с помощью жидкостного термостата ТЖ-ТС-01 (его температура изменяется в пределах $+30...+150^{\circ}\text{C}$, с точностью $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$). Через 15 мин, когда температура образца достигала требуемой величины в диапазоне от 37° до 43°C , проводилась регистрация цифровых изображений образца в проходящем свете. Далее жировая ткань в течение заданного времени подвергалась облучению с помощью источника, который размещался вплотную к образцу. Эффективность фотодинамического действия обеспечивалась совпадением спектра излучения источника со спектром поглощения красителя. По окончании облучения светом исследуемая жировая ткань каждые 5 мин проводилась регистрация цифровых изображений образца в проходящем свете.

С целью расширения динамического диапазона измерений проводилась аппроксимация световой характеристики ПЗС камеры типа DCM500 – зависимости яркости B от пропускания образца T . Затем компьютерное преобразование найденной аппроксимации $B(T)$ в зависимость $T(B)$ позволяло найти калибровочную кривую, по которой каждому измеренному значению яркости B можно поставить в соответствие пропускание биообъекта T . Все последующие расчеты проводились с учетом найденной калибровочной кривой.

Подготовка образцов для экспериментов *in vivo*:

Группу 2-х летних крыс-самцов из 30 особей содержали 14 суток, кроме стандартного рациона они получали 5 г сахара, 5 г сухого молока, 5 г подсолнечного масла и 5 г яичного порошка с тем, чтобы вызвать алиментарное ожирение. Ожирение для крыс-самцов считается при весе >400 г. На 15 сутки крыс декапитировали. Группу разбивали на 3 подгруппы по 10 особей. На каждой особи в области ребер делалась разметка. Первая зона была контрольная и данная область не подвергалась никакому воздействию (ни окраска, ни облучение). В зону 2 делалась инъекция красителя. Зона 3 подвергалась воздействию облучения источника. В зону 4 сначала делалась инъекция красителя, а затем производилось облучения источником. Крысы всё время воздействия находились под действием местного наркоза (золетил). Через 1 час после воздействия крыс декапитировали. Кусочки кожи и подкожной жировой клетчатки фиксировали в 10% растворе формалина. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. С помощью этих препаратов определяли изменения, происходящие в подкожной жировой клетчатке после фотодинамического воздействия.

В качестве математической обработки использовали преобразование массива данных яркостей полученных изображений в массивы данных пропускания с помощью калибровочной кривой, были вычислены стандартные статистические параметры (среднее значение, стандартное отклонение, дисперсия), для оценки достоверности полученных результатов и корреляций в *in vivo* экспериментах применяли непараметрическую статистику (критерий Кохрена (Кокрена), вычисление коэффициента Спирмена).

В **третьей главе** описано тепловое воздействие, оказываемое на жировую ткань при одновременном фотодинамическом воздействии.

На рисунках 3 (а-д) представлены изображения жировой ткани, окрашенной БЗ до и после ее облучения светодиодной лампой Ultra Lume Led 5, излучающей на $\lambda=442$ нм и $\lambda=597$ нм при плотности мощности $W=75$ мВт/см² в течение 5 минут при 50°C в течение времени наблюдения 118 минут. На рисунке 3 (е) представлен график зависимости пропускания жировой ткани от времени наблюдения, окрашенной БЗ до и после ее облучения светодиодной лампой Ultra Lume Led 5, излучающей на $\lambda=442$ нм и $\lambda=597$ нм при плотности мощности $W=75$ мВт/см² в течение 5 минут при 50°C в течение времени наблюдения 118 минут.

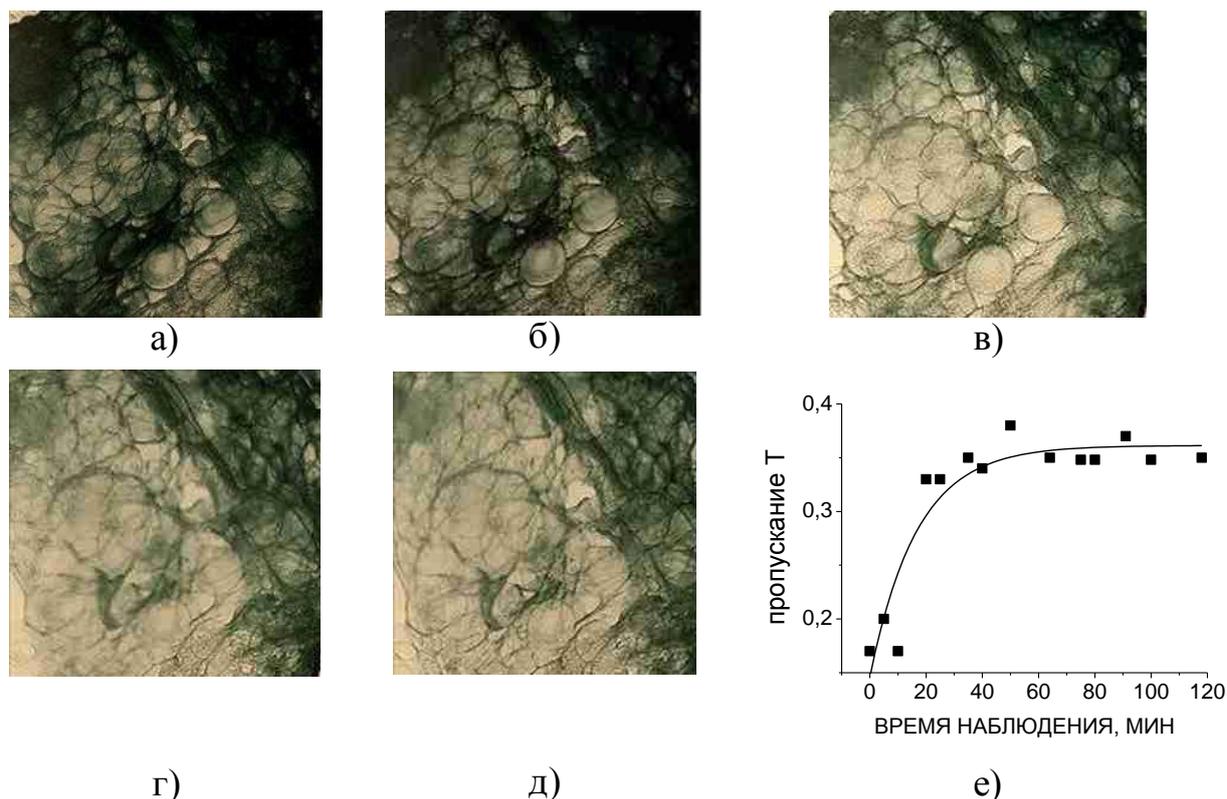


Рисунок 3 - Изображение жировых клеток, полученных при окрашивании БЗ в течение 10 мин и облучении светодиодной лампой Ultra Lume Led 5, излучающей на $\lambda=442$ нм и $\lambda=597$ нм при плотности мощности $W=75$ мВт/см² в течение 5 минут в течение времени наблюдения 118 минут при 50°C (а) 0 мин, б) 5 мин, в) 64 мин, г) 91 мин, д) 118 мин, е) зависимость пропускания ткани от времени наблюдения)

В результате были зарегистрированы заметные изменения формы и размеров жировых клеток, наблюдаемая кинетика для морфологии клеток согласуется с гипотезой об индуцированном липолизе, изменения существенно ускорились за счет фотодинамического воздействия.

В четвертой и пятых главах описано фотодинамическое воздействие на sensibilizированную бриллиантовым зеленым и индоцианиновым зеленым жировую ткань в видимой и ИК области светодиодного и лазерного излучения, соответственно. Обсуждено влияние излучения на спектры поглощения жировой ткани человека при ее sensibilизации красителями.

Было обнаружено, что под действием света поглощение во всем спектре сначала спадает, а затем восстанавливается. Восстановление спектра образца, окрашенного БЗ происходит через 150 мин, а ИЗ - через 180 мин (см. рисунки 4 и 5, соответственно). Однако восстановление спектров происходит не полностью, при этом меняется как соотношение

амплитуд полос, соответствующих мономерам и димерам молекул красителей, так и полуширины полос. Это может свидетельствовать об изменении связи красителя с окружающими молекулами в результате действия излучения (начальный этап изменений) и последующим восстановлением состояния красителя. Однако неполное соответствие начального и конечного спектров говорит о возможном изменении окружения молекул красителя. При этом в начале процесса, краситель находится частично в окружении растворителя, частично – в жировой ткани, а в конце процесса из-за испарения растворителя с поверхности образца основной вклад дает краситель, который взаимодействует с жировой тканью. Наблюдаемые изменения спектров поглощения могут быть также связаны с обесцвечиванием красителя и длительностью взаимодействия раствора красителя с тканью в процессе измерений, возможно влияние рассеяния света, обусловленного фазовыми переходами липидов, которые лежат в исследуемой области температур.

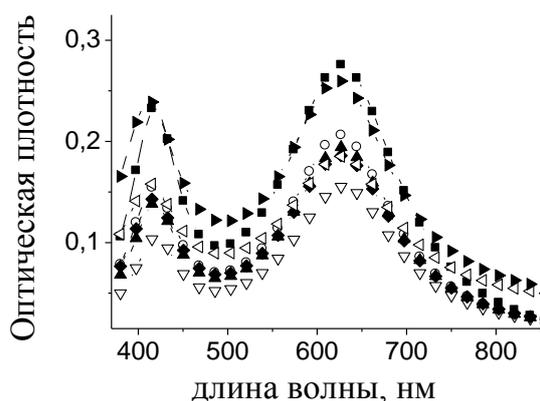


Рисунок 4 - Спектр поглощения подкожной жировой ткани, окрашенной БЗ, до (■) и после облучения в течение 15 мин, непосредственно после облучения (○) и после 30 (▲), 60 (▽), 90 (◆), 120 (◁) и 150 (►) мин. Концентрация раствора БЗ 6 мг/мл. Время окрашивания 10 мин. Температура образца 34°C.

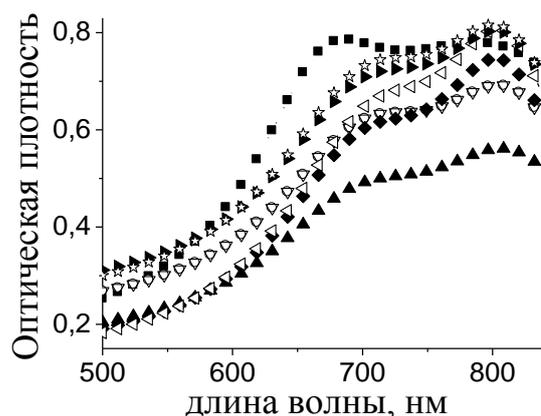


Рисунок 5 - Спектр поглощения подкожной жировой ткани, окрашенной ИЗ, до (■) и после облучения в течение 1 мин, непосредственно после облучения (○) и после 30 (▲), 60 (▽), 90 (◆), 120 (◁), 150 (►) и 180 (☆) мин. Концентрация раствора ИЗ 6 мг/мл. Время окрашивания 10 мин. Температура образца 34°C.

Проанализирована кинетика оптических свойств жировой ткани *in vitro* как результат фотодинамического действия.

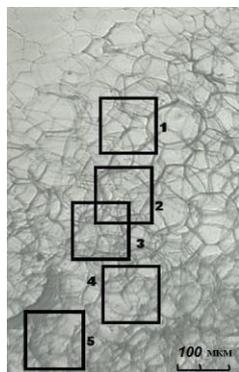


Рисунок 6 – Изображение в проходящем свете БЗ-сенсibilизированной жировой ткани при температуре 41°C до ее фотооблучения (обозначены зоны для их статистической обработки).

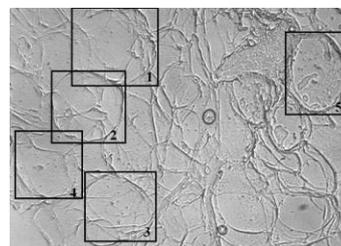


Рисунок 7 - Изображение в проходящем свете ИЗ-сенсibilизированной жировой ткани при температуре 34 °С до ее фотооблучения (отмечены 5 зон для статистической обработки).

Для каждой из пяти выбранной зон (для рисунка 6 и рисунка 7) рассчитывались значения $T_{\text{ср}}$ и $\sigma(T)$ в зависимости от времени наблюдения t (всего 30 пар значений параметров). В качестве примера на рисунках 7 и 8 приведены результаты для среднего по зоне наблюдения значения пропускания $T_{\text{ср}}$ и среднеквадратического отклонения $\sigma(T)$ величины T от $T_{\text{ср}}$ в зависимости от времени наблюдения t для вторых зон.

Анализ кинетики оптического пропускания сенсibilизированной жировой ткани после ее облучения светом позволил предположить, что возможным механизмом наблюдаемого явления является липолиз жировых клеток с сохранением их структуры и отсутствием их полной деструкции.

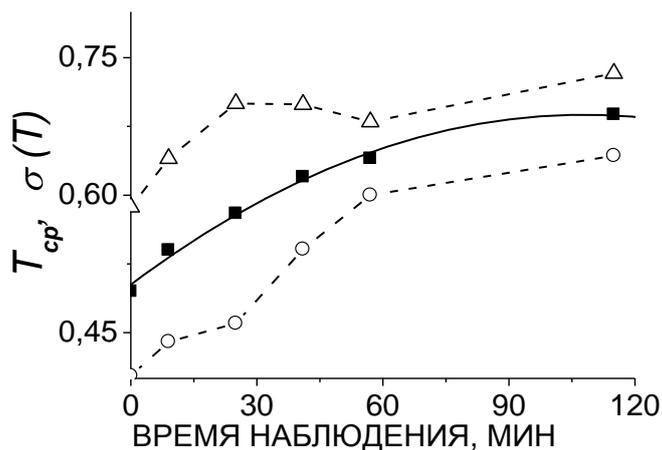


Рисунок 7 - Среднее по зоне наблюдения значение пропускания биоткани T_{cp} и отклонение $\sigma(T)$ величины T от T_{cp} как функция времени наблюдения для 2-ой зоны рисунка 6 ■ – экспериментальные значения T_{cp} ; ○ и △ – нижняя и верхняя границы отклонения $\sigma(T)$.

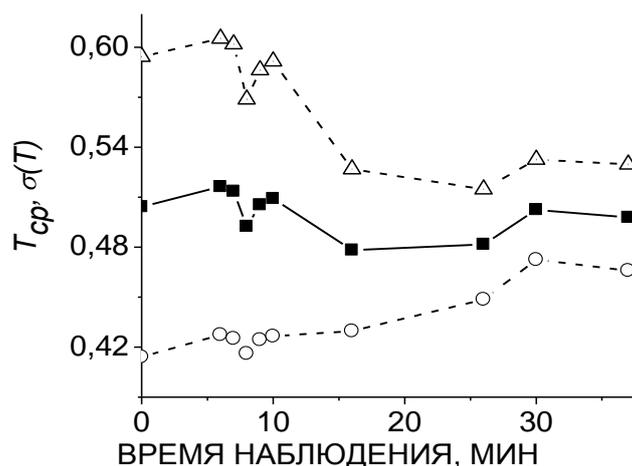


Рисунок 8 - Среднее по зоне наблюдения значение пропускания биоткани T_{cp} и отклонение $\sigma(T)$ величины T от T_{cp} как функция времени наблюдения для 2-ой зоны рисунка 7 ■ – экспериментальные значения T_{cp} ; ○ и △ – нижняя и верхняя границы отклонения $\sigma(T)$.

Увеличенное изображение участка жировой ткани представлено на рисунке 9, основное поле зрения занимает одна клетка размером около 50 мкм, в проекции мембраны клетки наблюдаются образования, три из них выделены прямоугольниками и пронумерованы.

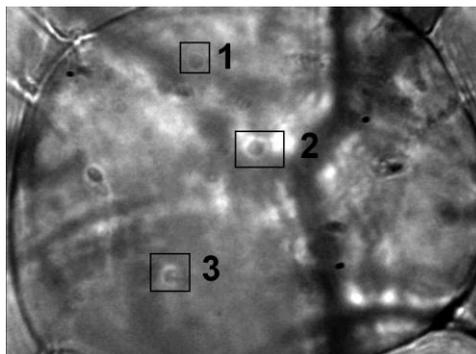


Рисунок 9 - Изображение жировой клетки, объектив 90х

Поскольку количество таких образований N для различных экспериментальных условий определяет характер воздействия красителей, тепла и излучения на жировые клетки, то в диссертации изучались зависимости для числа таких образований от условий воздействия на клетки.

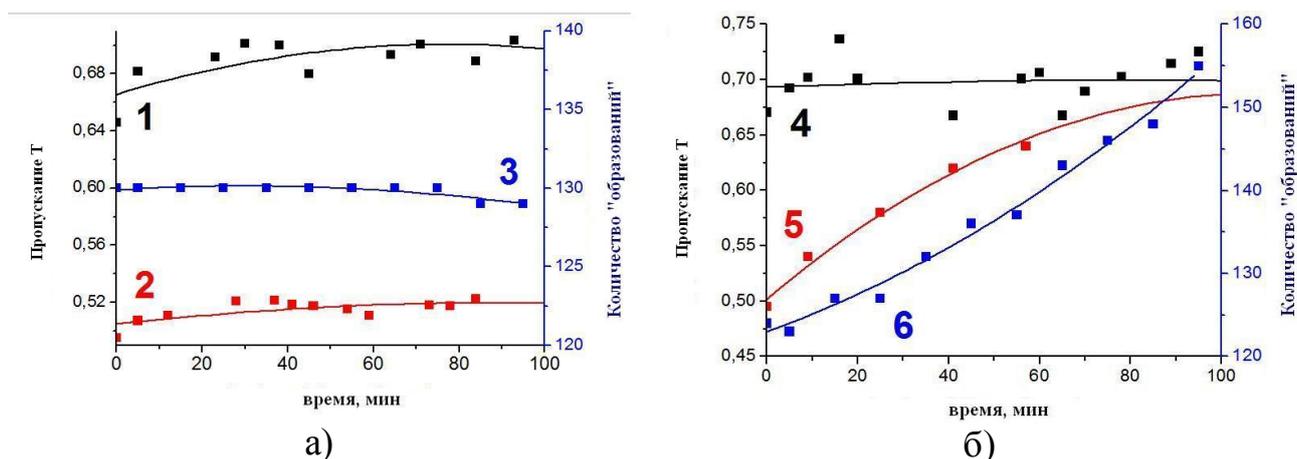


Рисунок 10 - Зависимости пропускания T (кривые 1, 2, 4 и 5) и количества "образований" (кривая 3 и б) от времени (а) - необлученные жировые клетки; б) облученные жировые клетки диодной лампой Ultra Lume Led 5, $\lambda=442$ нм и $\lambda=597$ нм при плотности мощности $W=75$ мВт/см² в течение 5 минут): 1 и 4 - ■ - образцы жировой ткани, обработанные водно-спиртовым раствором, 2 и 5 - ■ - образцы жировой ткани, окрашенные водно-спиртовым раствором БЗ, 3 и 6 - ■ - количество «образований» (пор) в проекции мембраны жировых клеток, окрашенных водно-спиртовым раствором БЗ. Левая вертикальная ось - для кривых 1, 2, 4 и 5, а правая - для кривых 3 и 6. Точки - экспериментальные данные, кривые - аппроксимация.

Исследованию подвергались 24 образца жировой ткани от одного донора по 3 образца для каждого из 4 типов экспериментов: изучение влияния водного и водно-спиртового растворов БЗ на жировую ткань,

анализ влияния водно-спиртового раствора на тот же биообъект, а также «контроль» - жировая ткань без какого-либо химического воздействия – 12 образцов. В то же время все вышеупомянутые эксперименты проводились в двух режимах – без облучения биообъекта (рисунок 10а) и при облучении (рисунок 10б), что суммарно соответствует 24 анализируемым срезам жировой ткани. Следует отметить, что графики на этих рисунках соответствуют лишь тем регистрируемым «образованиям», возможно порам, через которые выходит значительное количество цитоплазмы. Более мелкие поры оптически не регистрируются, хотя их количество может быть и большим. Зарегистрированные с помощью оптической цифровой микроскопии «образования» в проекции мембраны жировой клетки трактуются нами как капельки внутриклеточной жидкости, вытекающей через поры в мембране. В пользу такой связи свидетельствуют следующие результаты экспериментов:

- линейное возрастание числа наблюдаемых «образований» от концентрации спирта в растворе;
- наличие зависимости числа «образований» для образцов жировой ткани от типа химического и/или светового действия по сравнению с образцами жировой ткани в естественном состоянии.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) позволяет неинвазивно визуализировать структуру биообъектов *in vivo* и широко используется в биомедицинских целях, в том числе для визуализации морфологических изменений после ФДТ. Методом ОКТ было проведено исследование изменения показателя преломления жировой ткани при фотодинамическом воздействии *in vitro*. Поведение показателя преломления показывает его монотонное уменьшение с ростом времени наблюдения. Уменьшение эффективного показателя преломления в течение времени наблюдения до сотен минут составляет от 1.46 до 1.44 в экспериментах с БЗ и от 1.38 до 1.34 в экспериментах с ИЗ. Это может быть связано с уменьшением относительного показателя преломления рассеивателей, указывающего на иммерсионное оптическое просветление.

В **шестой главе** представлен гистологический анализ подкожной жировой клетчатки при фотодинамическом воздействии на кожу крыс *in vivo*.

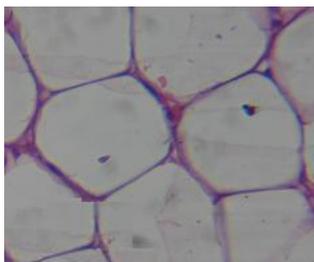


Рисунок 11 - Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки не подверженной никакому воздействию. Контрольный образец. Объектив 40×

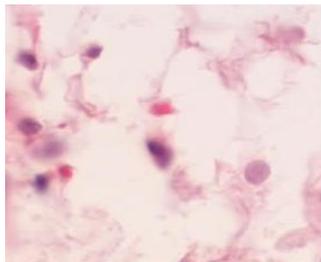


Рисунок 12 - Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки при подкожном введении раствора БЗ (10^{-4} мг/мл)

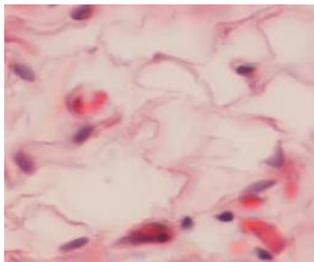


Рисунок 13 - Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки после облучения диодной лампой. Диодная лампа, 625 нм; плотность энергии, 720 Дж/см². Длительность облучения, 15 мин. Объектив 40×

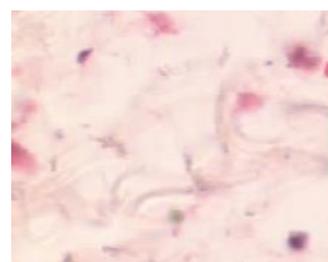


Рисунок 14 - Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки при подкожном введении раствора БЗ (10^{-4} мг/мл в физиологическом растворе) и последующем облучении диодной лампой. Диодная лампа, 625 нм; плотность энергии, 720 Дж/см². Длительность облучения, 15 мин. Объектив 40×

При подкожном введении ИЗ/БЗ, растворенного в физиологическом растворе изменения минимальны и характеризуются признаками отека. Особенностью морфологических изменений в тканях под действием лазерного облучения и облучения лампой является увеличение в размерах жировых клеток и разрушение клеточной мембраны у отдельных жировых клеток.

При сочетанном воздействии красителей и облучения в тканях развивались самые выраженные изменения, которые затрагивали все слои

кожи: эпидермис, дерму, жировую и мышечную ткани. В эпидермисе развивались дистрофия и некроз со слущиванием клеток эпителия. В подкожной жировой клетчатке – распространенная деструкция. В дерме – дезорганизация соединительной ткани в виде фибриноидного набухания и деструкция.

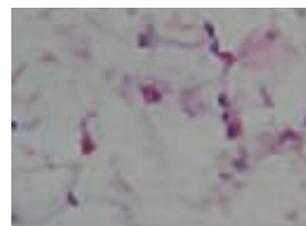
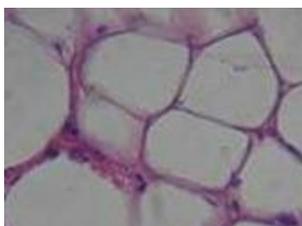


Рисунок 15 -	Рисунок 16 -	Рисунок 17 -
Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки при подкожном введении раствора ИЗ (0.5 мг/мл): раствор 2 (ИЗ в физиологическом растворе)	Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки после лазерного облучения. Диодный лазер, 808 нм; плотность энергии, 960 Дж/см ² . Длительность облучения, 1 мин. Объектив 40×.	Гистология (окраска гематоксилин-эозином) подкожной жировой клетчатки при подкожном введении раствора 2 ИЗ (ИЗ 0.5 мг/мл; в физиологическом растворе) и последующем лазерном облучении (960 Дж/см ² , время облучения 1 мин). Объектив 40×

Подкожное введение красителей БЗ/ИЗ приводит к увеличению поглощения излучения светодиодной лампы/лазера жировой тканью. Совместным действием красителя и источника излучения можно достигнуть полной деструкции жировой ткани.

В заключении приведены основные результаты работы.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. На основе анализа измеренных спектров поглощения можно утверждать о сдвиге положения максимумов полосы поглощения фотосенсибилизаторов в жировой ткани по сравнению с их спектрами в растворах. Сдвиг обусловлен взаимодействием молекул ИЗ и БЗ с коллагеном и другими белковыми молекулами, входящими в основном в состав межклеточного матрикса (септа, диаметр волокон порядка 50-200 нм). Анализируя спектры красителей в растворах и в тканях, важно

отметить также изменение формы спектров. Интенсивность пика, соответствующего вкладу молекул-мономеров, существенно снижается и становится сравнимой с интенсивностью пика от вклада молекул-димеров. На основе полученных спектров были рассчитаны концентрации красителей в ткани.

2. Для эффективного возбуждения используемых в работе молекул красителей были подобраны выпускаемые промышленностью и применяемые для медицинских целей источники излучения со спектрами излучения, максимально возможно соответствующими спектрам поглощения, используемых красителей. Например, широкополосные линии испускания диодной лампы (442 и 597 нм) достаточно хорошо соответствуют также широким полосам поглощения бриллиантового зеленого (440 и 650 нм). Максимум испускания диодного лазера (808 нм) попадает в полосу поглощения молекул индоцианинового зеленого, находящихся в связанном состоянии с белками в биоткани (805-810 нм) (см. рисунок 5).

3. Экспериментально обнаружено повышение оптического пропускания сенсibilизированной водно-спиртовым раствором бриллиантового зеленого при концентрации 6 мг/мл жировой ткани человека после ее облучения на длинах волн 442 и 597 нм с общей плотностью мощности излучения не превышающей 75 мВт/см^2 . Расчет временного и пространственного изменения оптического пропускания жировой ткани на основе статистической обработки цифровых изображений, полученных в проходящем свете, позволяет количественно оценить степень и кинетику процессов в жировой ткани в ответ на фотодинамическое действие. Анализ кинетики оптического пропускания сенсibilизированной жировой ткани после ее облучения позволил предложить метод «мягкой» редукции объема ткани путем липолиза жировых клеток без их существенной деструкции.

4. Вблизи поверхности мембран клеток жировой ткани впервые экспериментально зарегистрированы небольшие образования (структуры), размерами от 2 до 8 мкм, которые характеризуются изменяющимся во времени оптическим пропусканием и трактуются как капельки внутриклеточной жидкости, секретлируемой через образованные поры в мембране.

5. Показано увеличение эффективности процесса просветления жировой ткани, вызванного фотодинамическим эффектом, при нагреве ткани до температур 40-50 °С.

6. Впервые сделан анализ патоморфологических изменений подкожной жировой клетчатки при фотодинамическом воздействии на кожу крыс *in vivo*. Было показано, что выбором красителя (концентрации, способа введения в ткань) и параметров светового облучения (длина волны, плотность энергии) можно обеспечить контролируемую редукцию жировой ткани вплоть до ее полной деструкции. Например, при подкожном введении водно-спиртовых растворов бриллиантового зеленого и индоцианинового зеленого и чрезкожном облучении излучением диодной лампы (625 нм, плотность энергии 720 Дж/см²) и диодного лазера (808 нм, плотность энергии 960 Дж/см²) соответствующих областей на теле экспериментальных животных в коже, жировой и мышечной ткани животных развивались выраженные изменения, в том числе в подкожной жировой клетчатке наблюдалась распространенная деструкция.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых изданиях и журналах:

1. Янина И.Ю., Симоненко Г.В., Кочубей В.И., Тучин В.В. Спектры поглощения жировой ткани человека при ее сенсibilизации красителями // Оптика и спектроскопия. — 2010. — Т.109, №2. — С. 1303-1311
2. Tuchin V.V., Altshuler G.B., Yanina I.Yu., Kochubey V.I., Simonenko G.V. Fat tissue staining and photodynamic/photothermal effects // Proc. SPIE. Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VII, San Francisco, California, USA. — 2010. — V.7563. — P. 75630V1-7.
3. Doubrovsky V.A., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. Inhomogeneity of photo-induced fat cell lipolysis // Proc. SPIE. — 2011. — V. 7999. — P. 7999-21
4. Дубровский В.А., Дворкин Б.А., Янина И.Ю., Тучин В.В. Фотовоздействие на клетки жировой ткани человека *in vitro* // Цитология. — 2011. — Т.53, №5. — С. 423-432.
5. Yanina I.Y., Orlova T.G., Tuchin V.V., Altshuler G.B. The morphology of apoptosis and necrosis of fat cells after photodynamic treatment at a constant temperature *in vitro* // Proc.SPIE Mechanisms for Low-Light Therapy VI, edited by Michael R. Hamblin, Ronald W. Waynant, Juanita Anders. — 2011. — V.7887. — P. 78870X-1-7.
6. Yanina I. Yu., Bochko V.A., Alander J.T., and Tuchin V.V. Optical image analysis of fat cells for indocyanine green mediated near-infrared laser treatment // Laser Phys Lett. — 2011. — V.8, No.9. — P. 684-690.

7. Yanina I.Yu., Tuchin V.V., Suleymanova L.V., Bycharskaya A.B., Maslyakova G.N. Fat tissue histological study at NIR laser treatment of the human skin *in vitro* // Proc. SPIE. — 2011 — Vol.8092. — P. 809215-1-8.
8. Дубровский В.А., Янина И.Ю., Тучин В.В. Кинетика оптических свойств жировой ткани *in vitro* как результат фотодинамического действия // Биофизика. — 2012. — Т.57, №1. — С. 115–119.
9. 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 ICG- mediated photothermal/photodynamic treatment of the skin *in vivo* // JBO — 2012. — V.17, No.5. — P. 058002-1-9
10. Yanina I.Yu., Kochubey V.I., Tuchin V.V., Portnov S.A., Svenskaya Yu.I., Gorin D.A., Ponomareva E.G., Nikitina V.E. Effect of bacterial lectin on acceleration of fat cell lipolysis at *in vitro* diode laser treatment using encapsulated ICG // Proc. SPIE. — 2012. — V. 8337. — P. 83370F-1-7.
11. Yanina I.Yu., Navolokin N.A., Nikitina V.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., and Tuchin V.V. Studies of lipid peroxidation of rat blood after *in vivo* photodynamic treatment // Proc. SPIE. — 2012. — V. 8337. — P. 83370G-1-7.
12. Yanina I.Yu., Trunina N.A., Tuchin V.V. Temporal change of adipose tissue refractive index at photodynamic treatment: *in vitro* study using OCT // Proc. SPIE. — 2012. — Vol. 8222. — P. 82221G- 1-6.
13. Doubrovsky V.A., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. Porosity of photo-induced fat cell lipolysis // Proc. SPIE. — 2012. — Vol. 8427. — P. 842748-1-9.
14. Yanina I.Yu., Trunina N.A., Tuchin V.V. Optical coherence tomography of adipose tissue at photodynamic/photothermal treatment *in vitro* // Journal of Innovative Optical Health Sciences on Advances. — 2013. — V. 6, No.2. — P. 1350010-1-7
15. Yanina I.Yu., Doubrovsky V.A., Tuchin V.V. Control of optical transmittance of fat tissue slices at NIR photodynamic action mediated by indocyanine green // Proc. SPIE. — 2013. — V. 8699. — P. 86990C-1-7.
16. Янина И.Ю., Дубровский В.А., Тучин В.В. Оптическая регистрация пор в мембране жировой клетки / И. Ю. Янина, В. А. Дубровский, В. В.Тучин // Оптика и спектроскопия — 2013. — Т.115, №2. — С. 62-67.
17. Ганилова Ю.А., Долмашкин А.А., Дубровский В.А., Янина И.Ю., Тучин В.В. Оптическая цифровая микроскопия для цито- и гематологических исследований *in vitro* // Оптика и спектроскопия. — 2013 — Т.115, №2. — С. 68-74.

Статьи в материалах международных и российских конференциях:

1. Genina E.A., Zubkova E.A., Korobko A.A., Yanina I.Yu., Bashkatov A.N., Kamenskikh T.G., Galanzha V.A., Tuchin V.V. Diffusion of Cortixin and Retinalamin in eye sclera // Saratov Fall Meeting 2006: Optical Technologies in Biophysics and Medicine VIII, edited by Valery V. Tuchin, Proc. SPIE. — 2007. — Vol. 6535. — P. 65351Y- 1-6
2. Tuchin V.V., Yanina I.Yu., Simonenko G.V. Destructive fat tissue engineering using photodynamic and selective photothermal effects // *Proc SPIE*. — 2009. — V.7179. — P.71790C.1-11
3. Янина И.Ю., Симоненко Г.В., Тучин В.В. Физические способы воздействия на жировую ткань // Проблемы оптической физики, Материалы 11-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2008. — С. 64-76
4. Тучин В.В., Дубровский В.А., Янина И.Ю. Статистическая обработка цифровых фотографий как метод анализа фотодинамической деструкции жировой ткани *in vitro* // Проблемы оптической физики, Материалы 12-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2009. — С. 40-45
5. Бочко В.А., Аландер Я.Т., Тучин В.В., Янина И.Ю. Медицинская визуализация и терапия с использованием индоцианина зеленого // Проблемы оптической физики, Материалы 12-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2009. — С. 56-63
6. Yanina I.Yu., Bochko V.A., Simonenko G.V., Välisuo P.O., Alander J.T., and Tuchin V.V. Photo analysis methods for fat cell destructive engineering // Proc. SPIE. — 2010. — Vol. 7547. — P. 754708-1-8
7. Дубровский В.А., Янина И.Ю., Тучин В.В. Регистрация неравномерности фотоиндуцированного липолиза жировых клеток методом цифровой микрофотографии действия // Проблемы оптической физики, Материалы 13-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2011. — С. 96-105
8. Янина И.Ю., Симоненко Г.В., Тучин В.В., Медведев Б.А. Лабораторная работа «Фотодинамическая терапия жировой ткани» // Проблемы оптической физики, Материалы 13-ой Международной

молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2011. — С. 122-130

9. Козина А.М., Янина И.Ю., Свенская Ю.И., Генина Э.А., Портнов С.А., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Фотодинамический липолиз с использованием индоцианина зеленого // Проблемы оптической физики, Материалы 13-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2011. — С. 113-118

10. Ганилова Ю.А., Дубровский В.А., Янина И.Ю., Тучин В.В. Особенности методики оптической цифровой микроскопии для биомедицинских исследований *in vitro* // Проблемы оптической физики, Материалы 14-ой Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофизике, Изд.-во «Новый ветер», Саратов. — 2012. — С. 30-38

11. Янина И. Ю. Фотодинамическое локальное разрушение жировой ткани *in vitro* // Материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием. Молодежь и наука, итоги и перспективы YSRP'08. — 2009. — С. 7

12. Янина И. Ю. Выявление фотодинамической деструкции жировой ткани с помощью непараметрических статистических критериев // Материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием. Молодежь и наука, итоги и перспективы YSRP'09. — 2010. — С. 59

13. Янина И. Ю. Статистическая обработка цифровых фотографий как метод анализа фотодинамической деструкции жировой ткани *in vitro* // Материалы 70 научно-практической конференции студентов и молодых учёных Саратовского медицинского университета. «Молодые ученые – здравоохранению региона» МУ-ЗР'09. — 2010. — С. 238-239.

14. Янина И. Ю. Изменение оптических свойств жировой ткани в результате фотодинамического действия *in vitro* // Материалы 71 научно-практической конференции студентов и молодых учёных Саратовского медицинского университета. «Молодые ученые – здравоохранению региона» МУ-ЗР'10. — 2011. — С. 265-266.

15. Козина А.М., Янина И.Ю. Фотодинамический липолиз с использованием индоцианина зеленого // Материалы 71 научно-практической конференции студентов и молодых учёных Саратовского

медицинского университета. «Молодые ученые – здравоохранению региона» МУ-ЗР' 10. — 2011. — С. 259.

16. Янина И.Ю., Ганилова Ю.А. Опыт цитологических исследований на основе оптической цифровой микрофотографии // Материалы 72 научно-практической конференции студентов и молодых учёных Саратовского медицинского университета. «Молодые ученые – здравоохранению региона» МУ-ЗР' 11. — 2012. — С. 268

17. Янина И.Ю., Гордеев А.В., Дахчуков Ш.Р. Исследование фотохимического образования пор в мембране жировой клетки на основе цифровой микроскопии // Материалы 73-й студенческой научно-практической конференции в рамках первой Всероссийской недели науки с международным участием, посвященной дню российской науки «Молодые ученые – здравоохранению», Издательство Саратовского медицинского университета. — 2012. — С. 192

18. Янина И.Ю., Симоненко Г.В., Тучин В.В. Инженерия жировой ткани при фотодинамической и фототермической деструкции *in vitro* / И. Ю. Янина, Г. В. Симоненко, В. В. Тучин // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика - 2010» 21-25 июня 2010. Сборник материалов. Москва, Секция Оптико-информационные технологии и биомедицинская фотоника. Устные доклады. — 2010. — Т.3. — С. 35-37

Подписано к печати 11.07.2013 года. Формат 60x48 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,75 Тираж 100 экз. Заказ № 149-Т

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