

Саратовский национальный исследовательский  
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

---

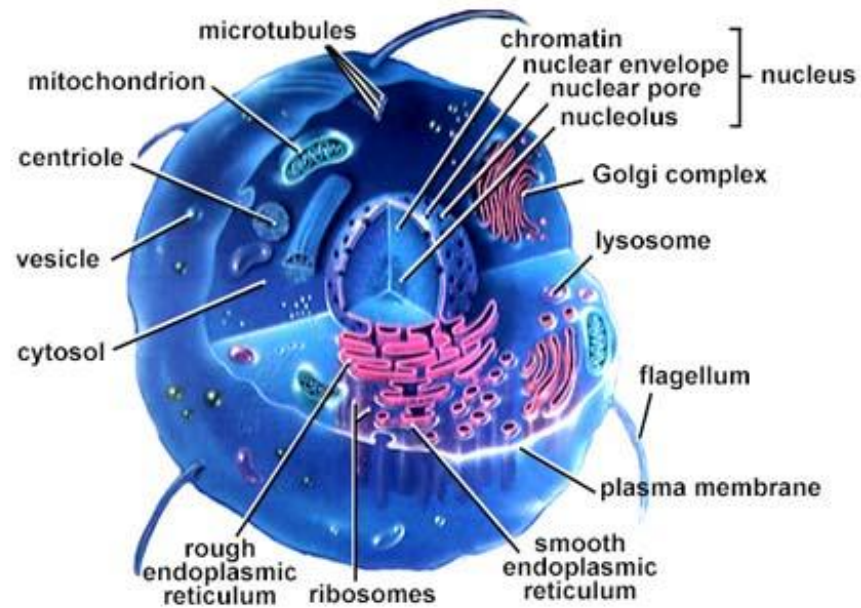
# Оптическое просветление биотканей

профессор кафедры оптики и биофотоники д.ф.-м.н., профессор К.В. Березин

---

# Оптическое просветление биотканей

---



животная клетка



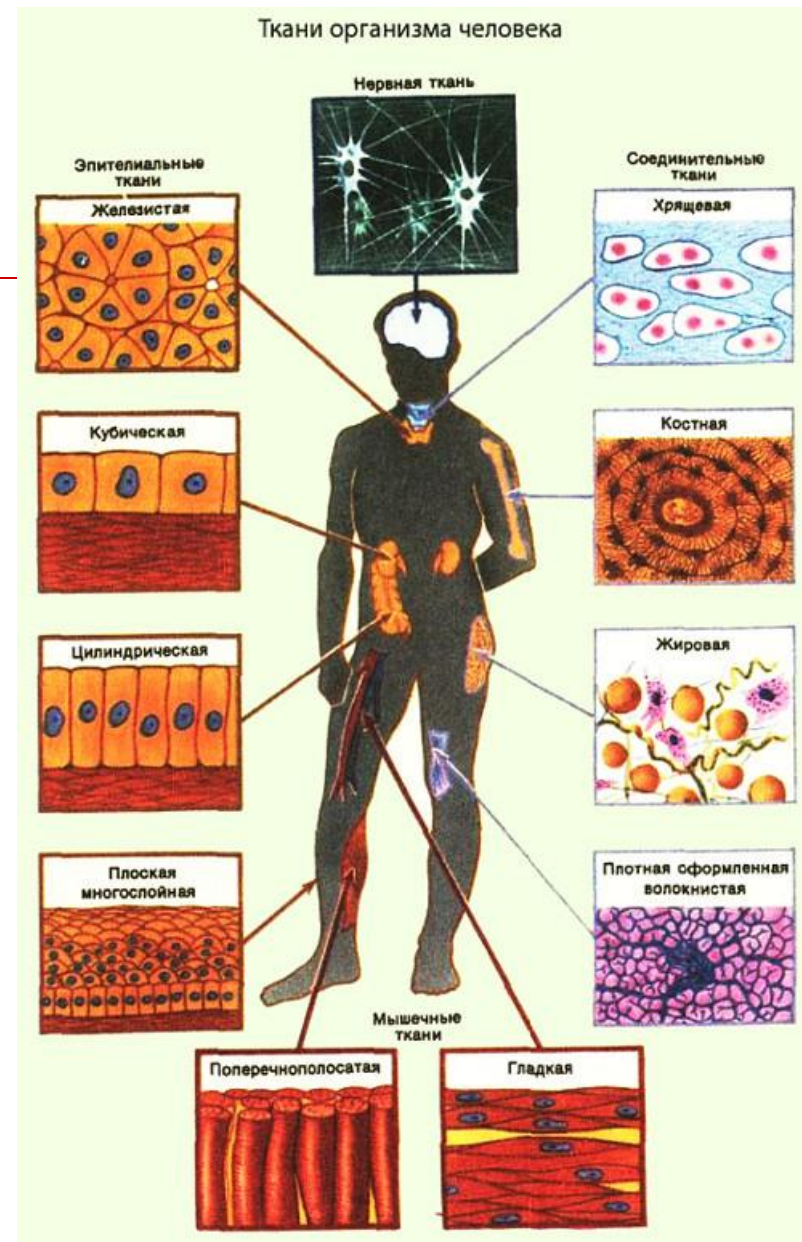
фиброзная ткань

Показатели преломления: коллагеновые фибриллы = 1.48-1.49,  
внутриканевая жидкость = 1.35, цитоплазма = 1.37, ядро = 1.39,  
органеллы = 1.38-1.41

---

# Введение

Знание оптических параметров биологических тканей является принципиально важным для разработки оптических моделей биологических тканей, дозиметрии лазерного излучения при планировании хирургических и терапевтических процедур и проведении диагностики различных заболеваний с использованием оптических методов.



Ри.1. Ткани организма человека

# Начало

---

Оптическая неинвазивная диагностика появилось примерно в середине 1980-х годов, когда стали доступными персональные компьютеры, световоды и лазеры. Некоторые его методы схожи с методами лабораторной спектрофотометрии и люминесцентного анализа, но освещению и последующему изучению здесь подвергаются не образцы крови или отдельные фрагменты биотканей, а непосредственно живые ткани — тело пациента. Важно, что эл-магн. излучение незначительной интенсивности абсолютно безвредно.



Световоды и лазеры в медицине

---

# Методы и механизмы оптического просветления

---



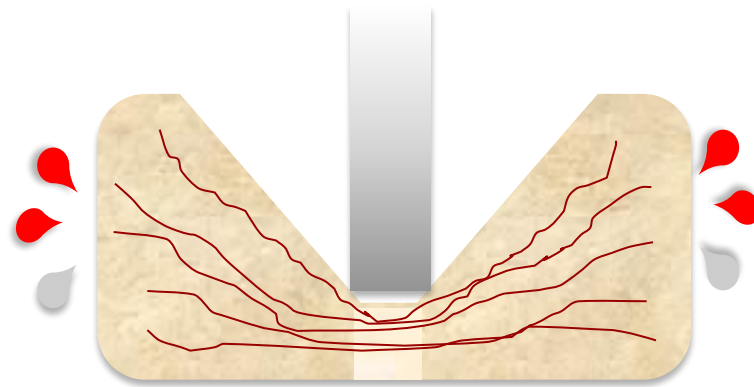
Фиброзная ткань (склера)  
под электронным  
микроскопом, продольный  
срез (×2900)

# Компрессия

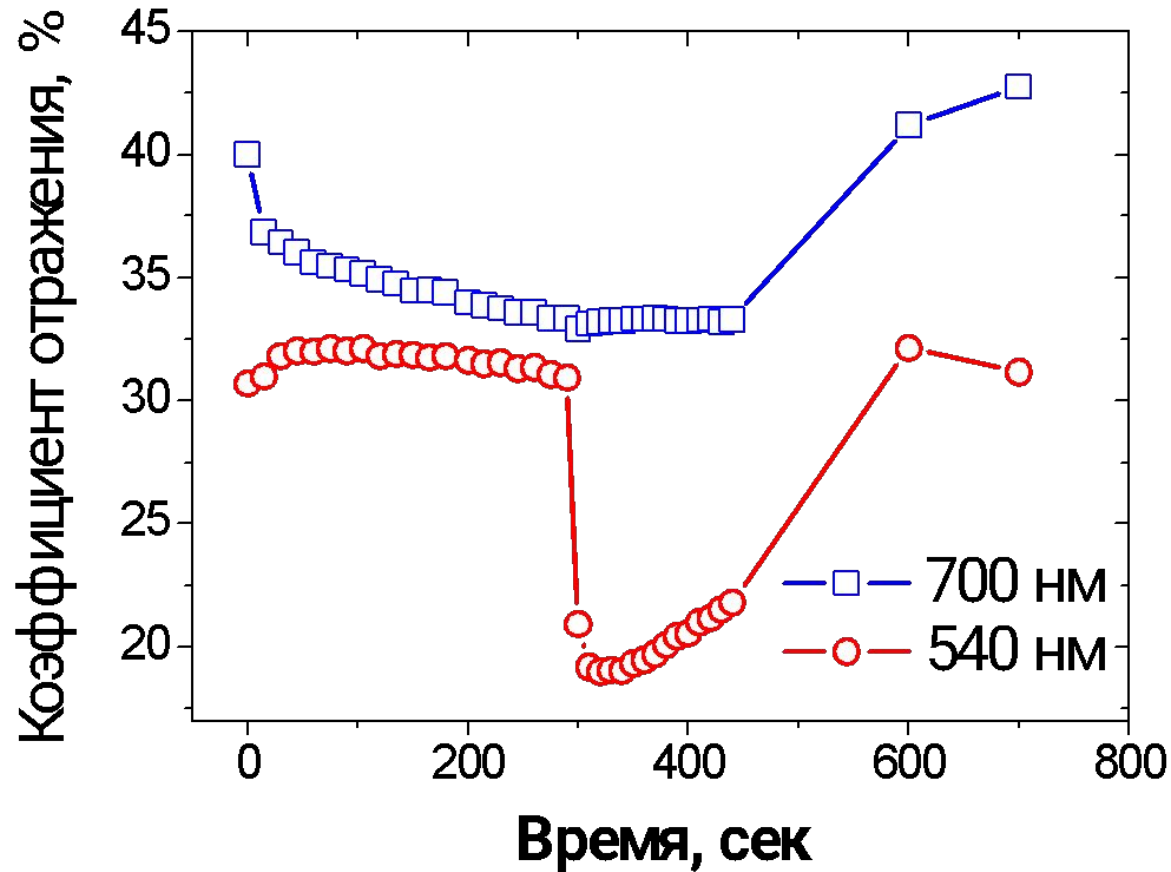
---

Увеличение прозрачности ткани происходит за счет увеличения:

- ✓ оптической однородности, которая достигается удалением крови и внутритканевой жидкости (воды) из области компрессии
- ✓ упорядоченности структурных компонентов



# Компрессия



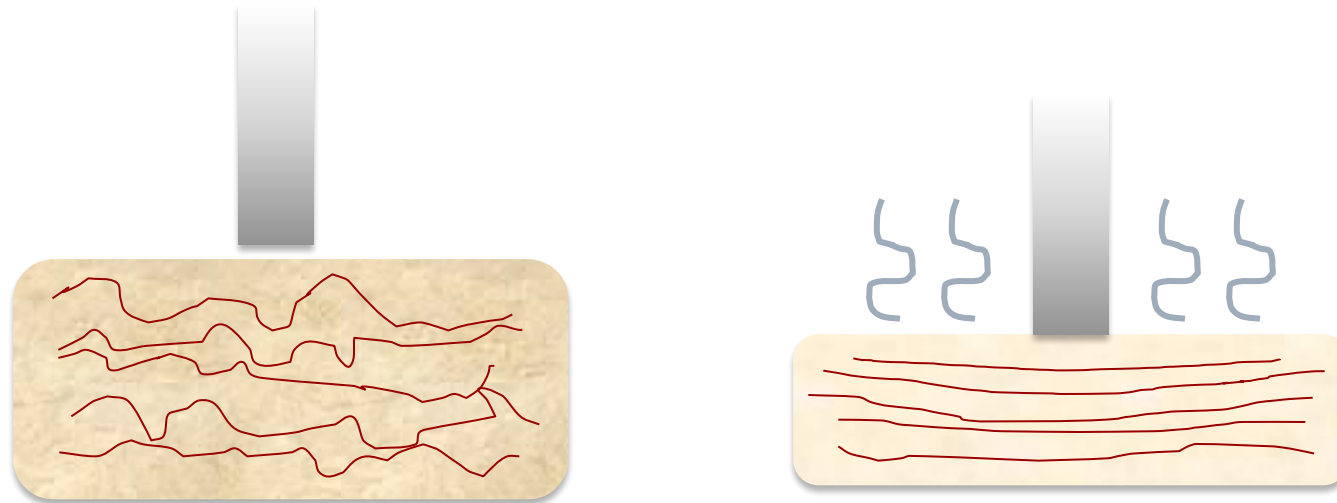
Кинетика спектров отражения кожи человека *in vivo*, измеренные на двух длинах волн в условиях внешней механической компрессии (интервал времени 0-290 сек) и при ее снятии (интервал времени свыше 290 сек)

# Дегидратация

---

Полное оптическое пропускание образца ткани увеличивается за счет

- ✓ уменьшения его толщины
- ✓ внутреннего выравнивания показателей преломления
- ✓ увеличения плотности упаковки и упорядоченности волокон





## Оптическая иммерсия

---

Метод пропитывания биотканей различными химическими растворами, гелями и маслами, основанный на согласовании показателей преломления структурных компонент биотканей и окружающего их вещества, получил наиболее широкое распространение под названием **«оптическое просветление биотканей»** (в англоязычной литературе – ***tissue optical clearing***). Временное селективное просветление верхних слоев биотканей является ключевым моментом развития техники структурного и функционального зондирования биотканей.

---

# Оптическая иммерсия

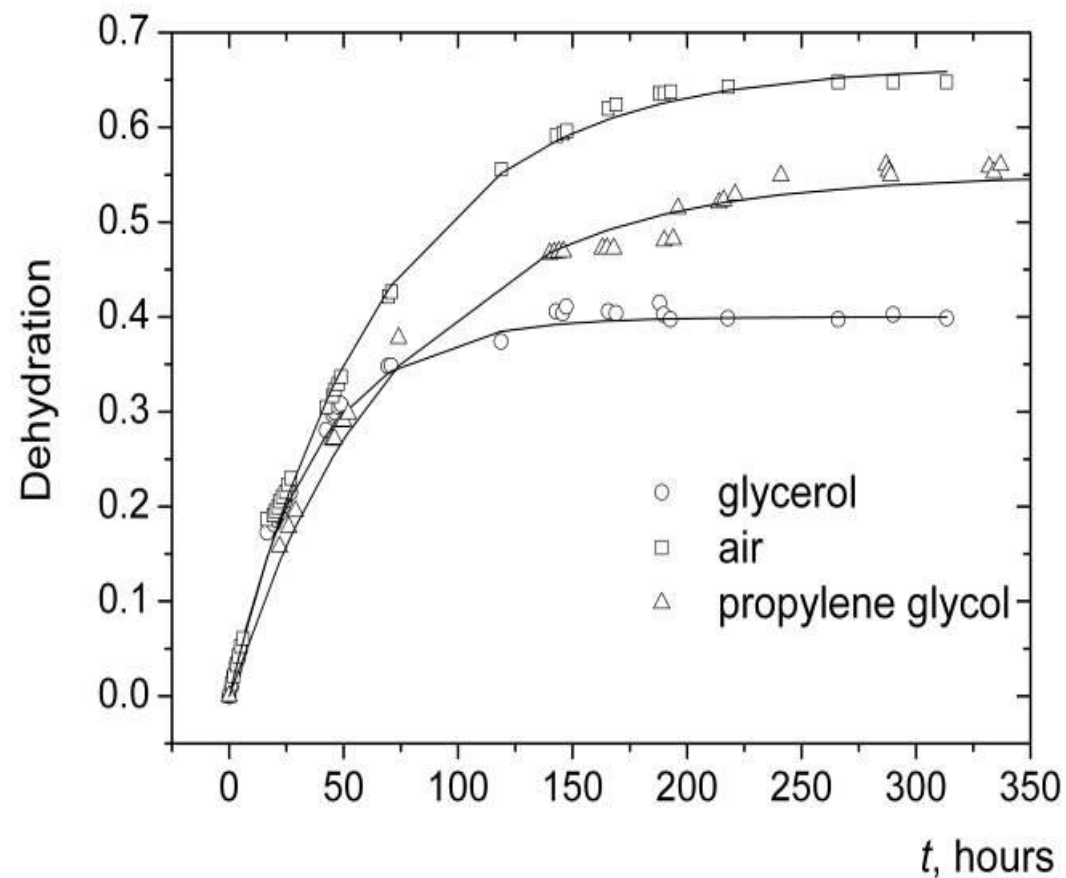
---

В настоящее время для объяснения снижения светорассеяния биотканей за счет влияния просветляющего агента(ПА) предложено несколько механизмов:

- ❑ осмотическая дегидратация биоткани;
  - ❑ частичная замена внутритканевой жидкости на ПА, при которой происходит согласование показателей преломления структурных компонент биоткани;
  - ❑ структурная модификация или диссоциация коллагена биоткани.
-

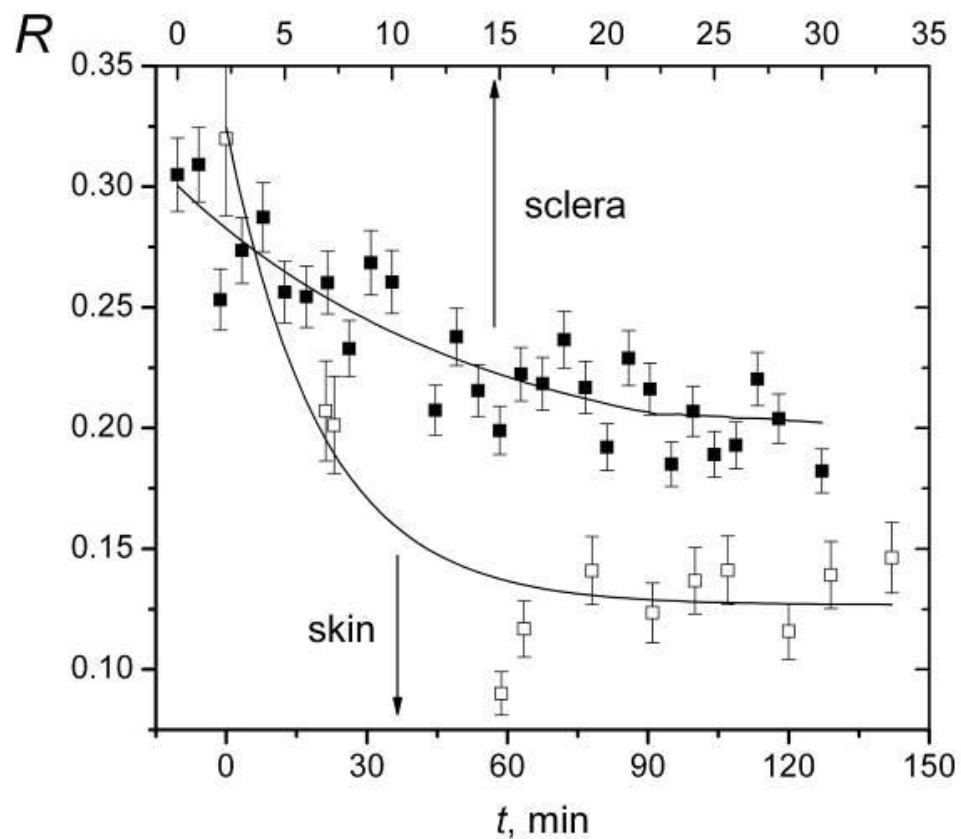
# Оптическая иммерсия

Кинетика дегидратации кожи при испарении и применении гиперосмотических агентов – глицерина и пропиленгликоля



# Оптическая иммерсия

Кинетика спектров отражения склеры глаза кролика и кожи человека *in vivo*, измеренные на длине волны 700 нм в различные моменты времени после введения 40%-водного раствора глюкозы



# Оптическая иммерсия

---

## Коллимированно е пропускание

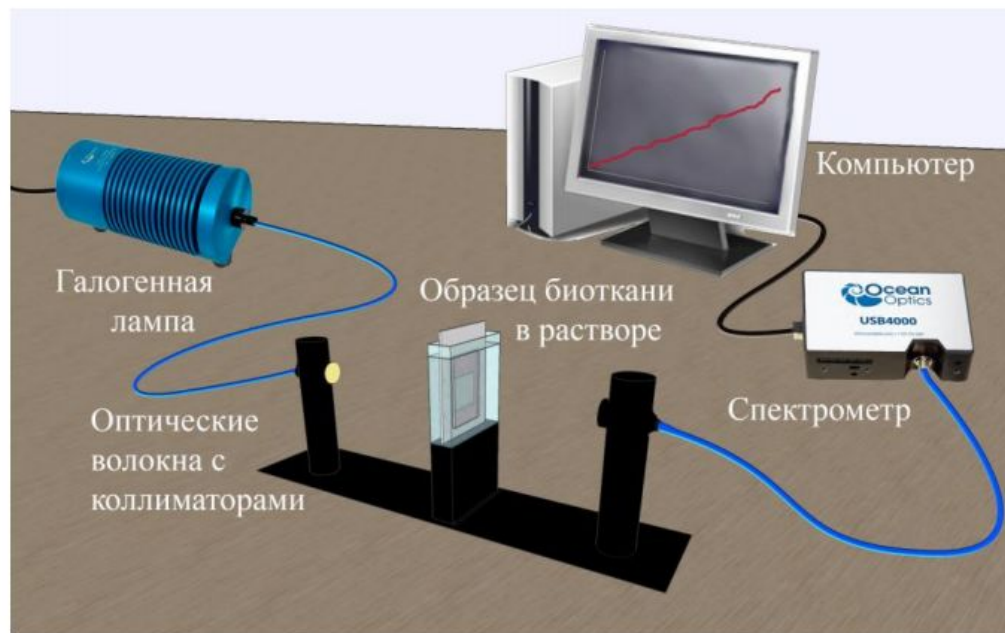
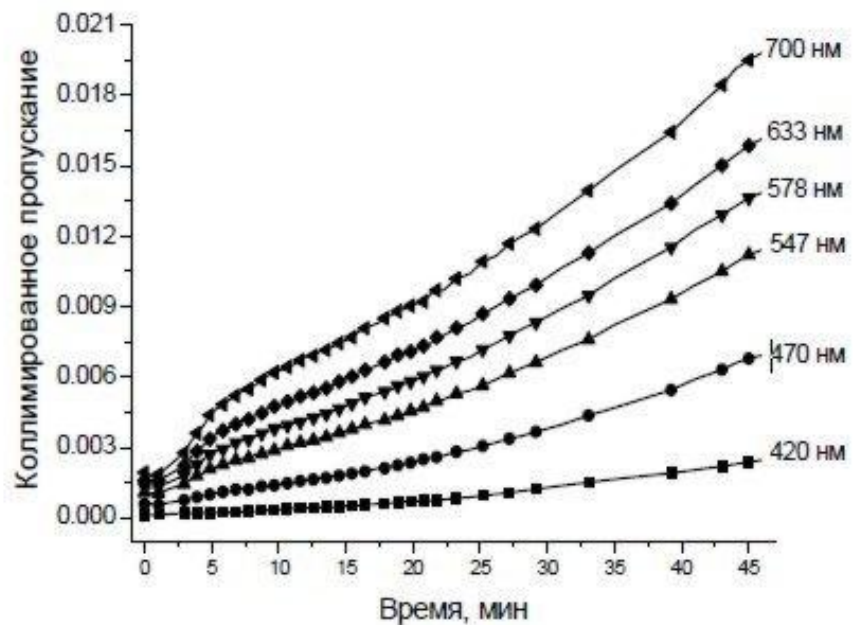


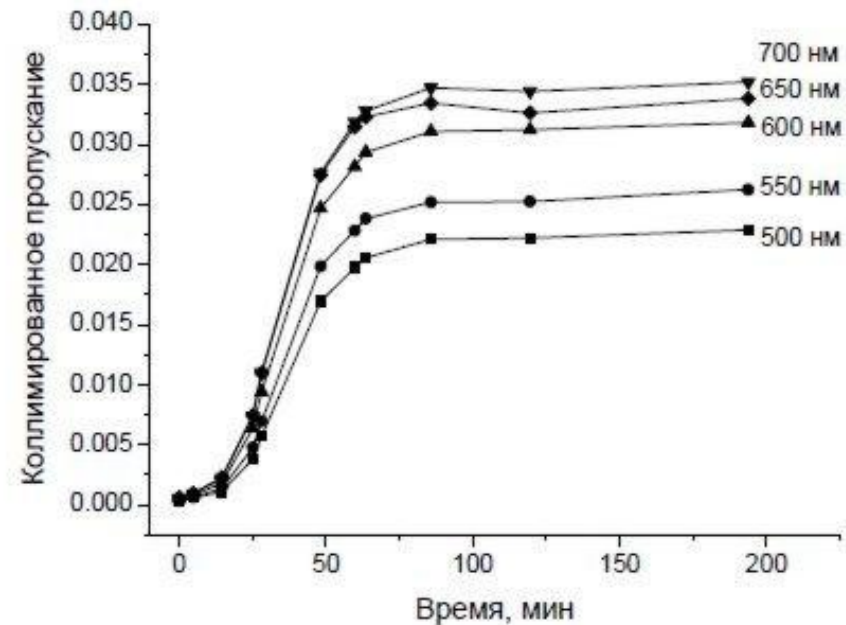
Рисунок 1. Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца биоткани, включающая в себя галогенную лампу HL-2000, оптические волокна с коллиматорами, кювету с образцом на пластиковой пластине, погруженной в раствор, многоканальный спектрометр USB4000-VIS-NIR и компьютер

---

# Оптическая иммерсия



Динамика изменения коллимированного пропускания образца кожи помещенного в глицерин



Динамика изменения коллимированного пропускания образца кожи помещенного в 40%-раствор глюкозы

# Оптическая иммерсия

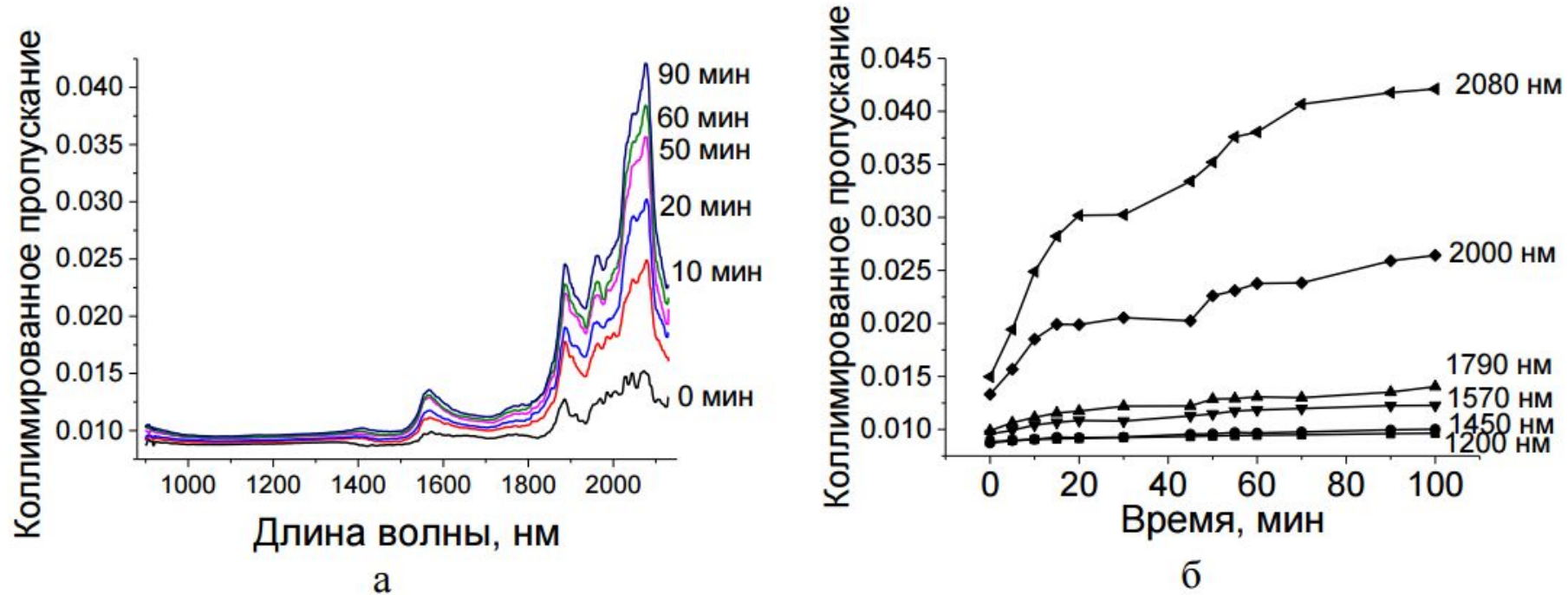
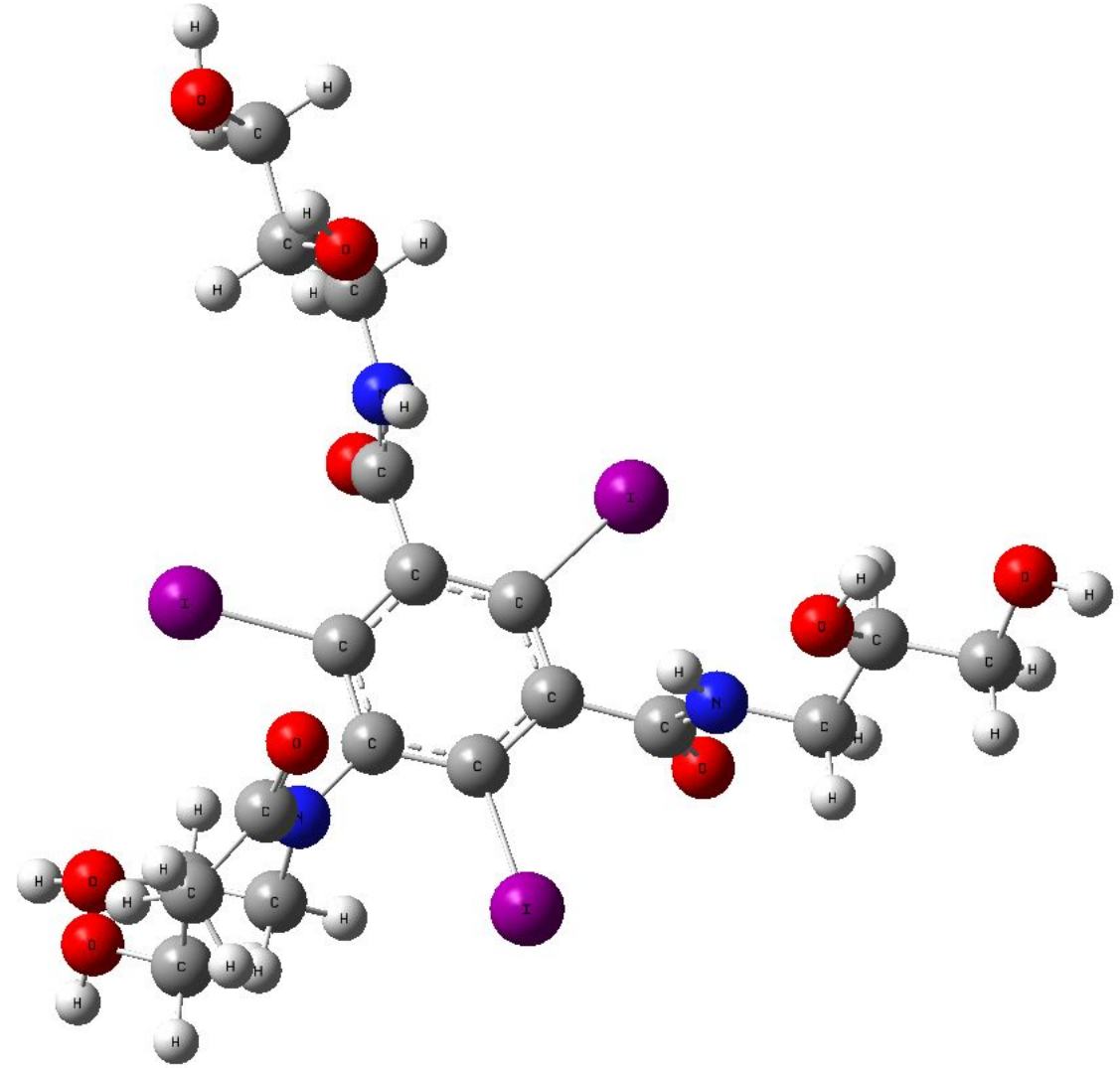


Рисунок 13. Спектры (а) и кинетика изменения (б) коллимированного пропускания образца кожи *ex vivo* помещенного в «Омнипак»

# Оптическая иммерсия

---

Молекулярная строение  
молекулы йогексола (омнипак)



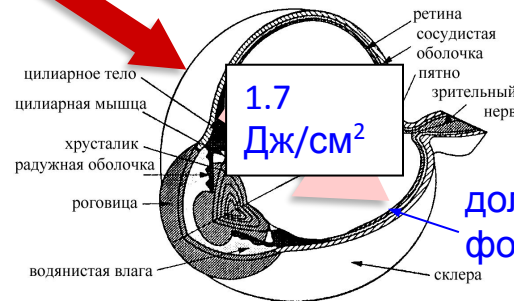


# Применения метода оптического просветления биотканей

## Трансклеральные лазерные операции

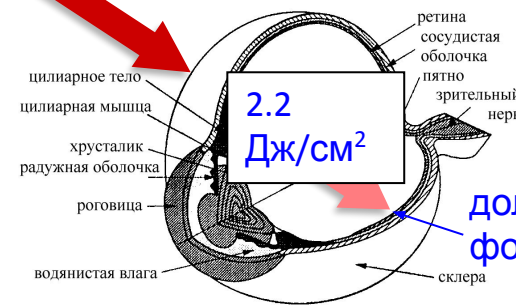
Склера покрывает глазное яблоко снаружи. Она относится к фиброзной оболочке глаза, включающей также роговицу. Однако, в отличие от роговицы, склера является непрозрачной тканью, потому что формирующие ее коллагеновые волокна располагаются хаотично.

До оптического просветления склеры  
700 нм, 5 Дж/см<sup>2</sup>



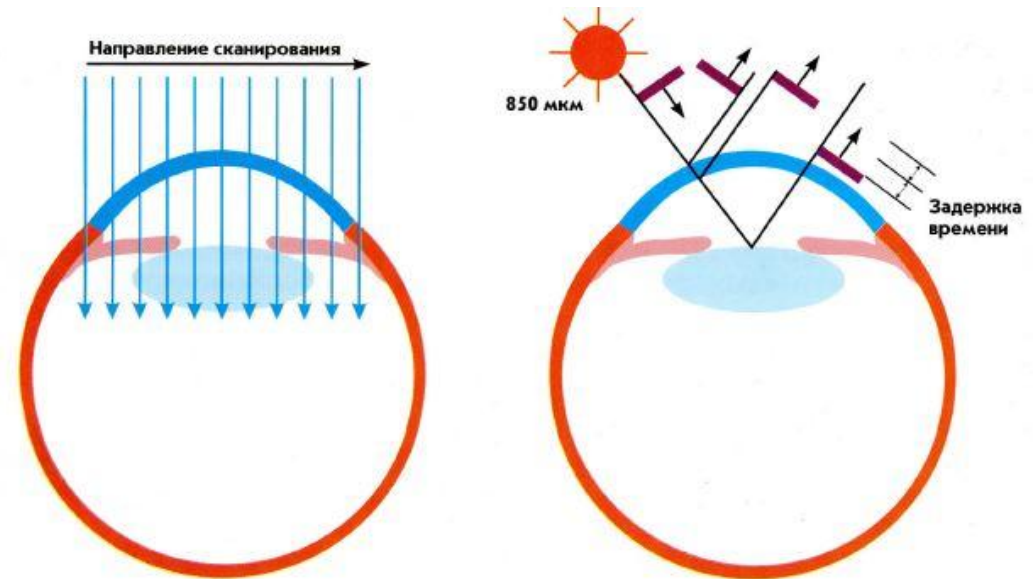
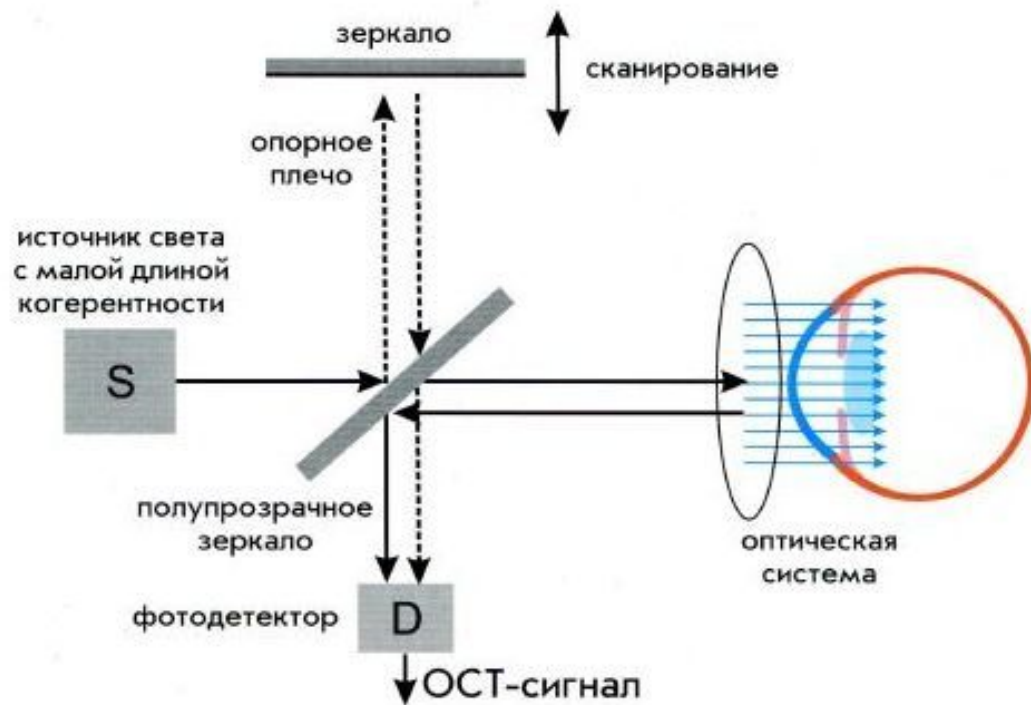
После оптического просветления склеры

700 нм, 5 Дж/см<sup>2</sup>



# Применения метода оптического просветления биотканей

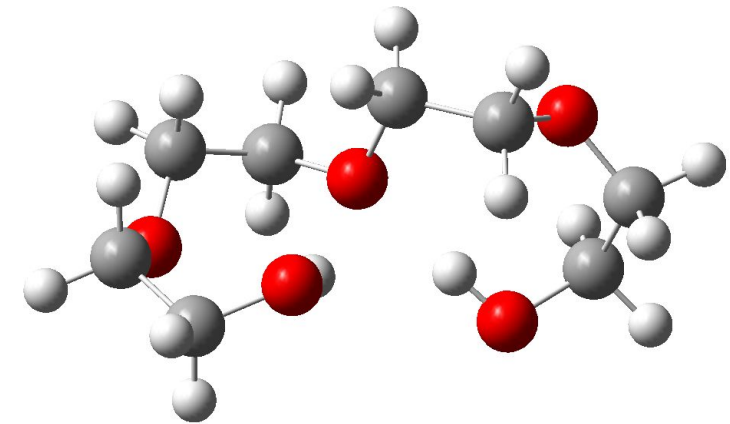
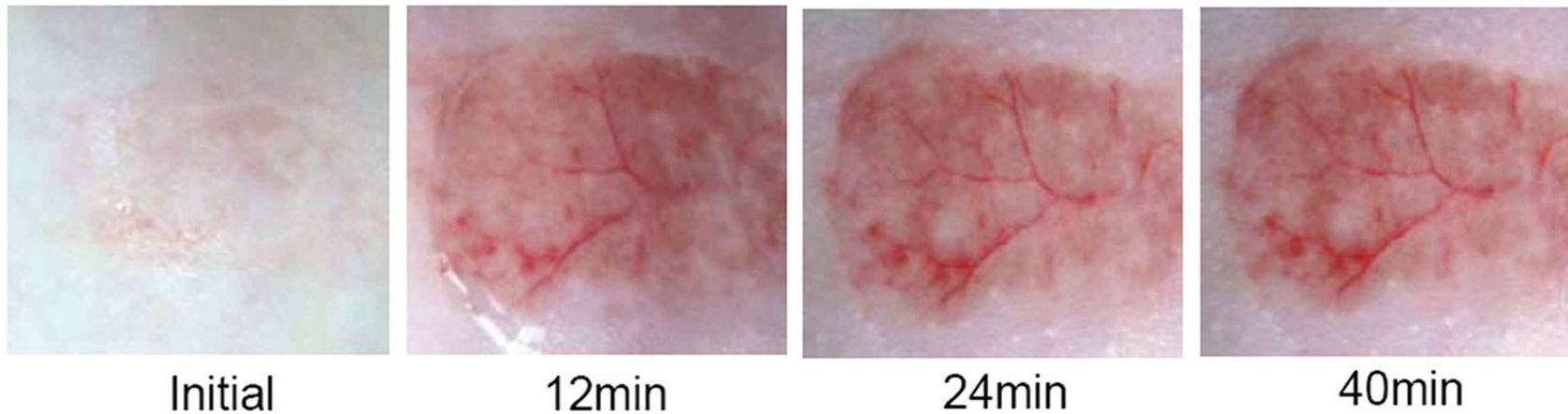
## □ Оптическая когерентная томография



# Применения метода оптического просветления биотканей

---

Улучшение визуализации подкожных кровеносных сосудов



ПЭГ-200

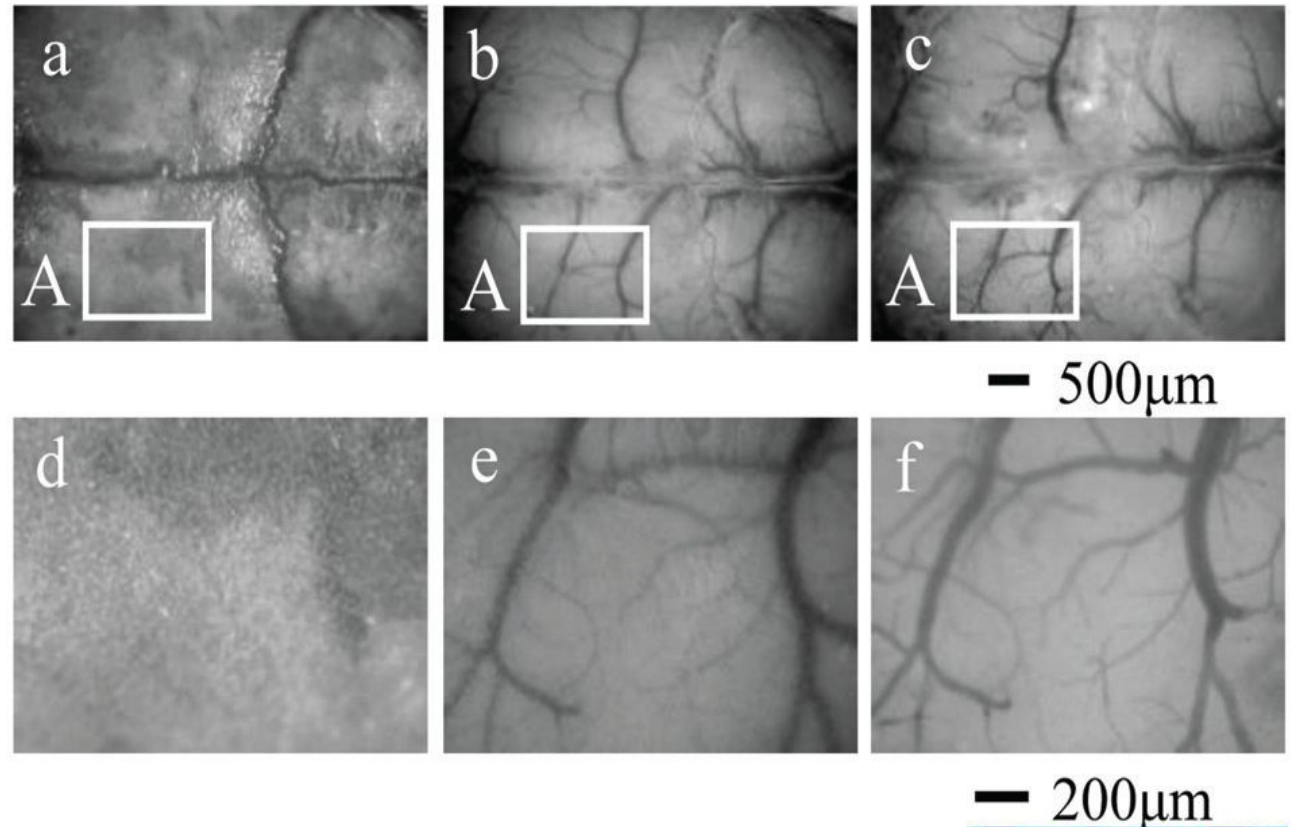
Изображения участка кожи крысы *in vivo* до и в процессе оптического просветления с помощью раствора ПЭГ-400 и тиазона

---

# Применения метода оптического просветления биотканей

## Улучшение визуализации кровеносных сосудов мозга

Изображения черепа  
мыши *in vivo* до и после  
оптического  
просветления



# Применения метода оптического просветления биотканей

---

## Улучшение визуализации подкожной татуировки

Изображения поверхности кожи *in vitro* с татуировкой:

а) образец с татуировкой до воздействия глицерина;

б) образец с татуировкой после микроперфорации поверхности и 24-часового воздействия глицерина

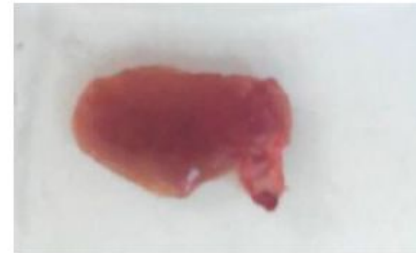


# Применения метода оптического просветления биотканей

---



а



б



в

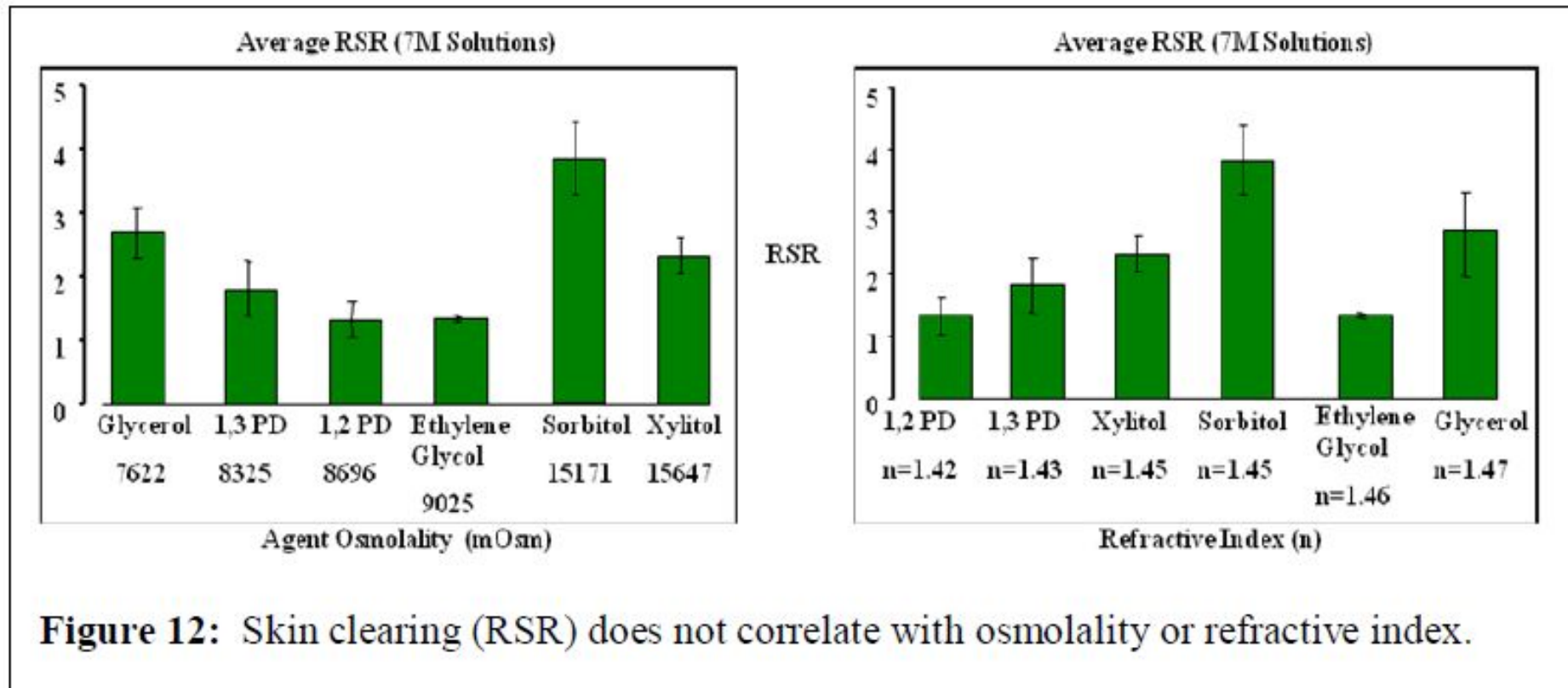


г

Рисунок 22. Изображения образцов кожи и сердечной мышцы до (а, б) и после (в, г) оптического просветления в 70%-растворе глицерина

---

# Механизм оптического просветления



**Figure 12:** Skin clearing (RSR) does not correlate with osmolality or refractive index.

# Механизм оптического просветления

---

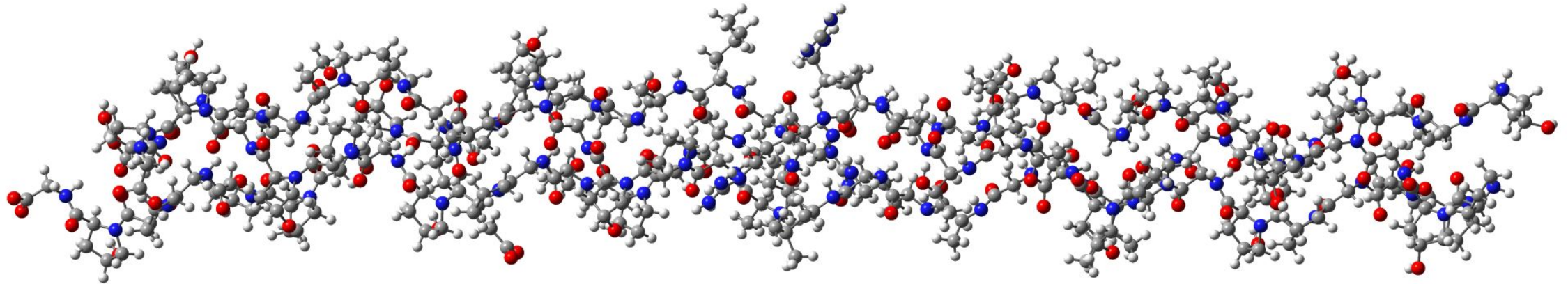
**Table 6:** Average number of hydrogen bonds and bridges formed.

| <b>Chemical</b> | <b>Hydrogen<br/>Bonds (#/ps)</b> | <b>Bridges (#/ps)</b> |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------|
| Ethylene glycol | 0.73430                          | 0.2758                |
| 1,2-propanediol | 0.75304                          | 0.3174                |
| 1,3-propanediol | 0.76562                          | 0.3279                |
| Glycerol        | 0.78600                          | 0.3318                |
| Xylitol         | 0.78700                          | 0.3525                |
| Sorbitol        | 1.51854                          | 1.0866                |

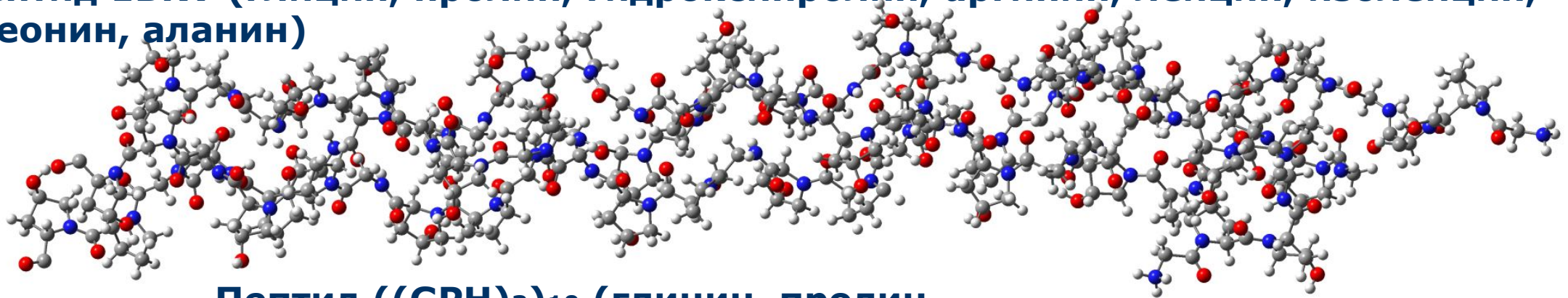


# Молекулярные модели белка коллагена

---



**Пептид 1VKV (глицин, пролин, гидроксипролин, аргинин, лейцин, изолейцин, треонин, аланин)**

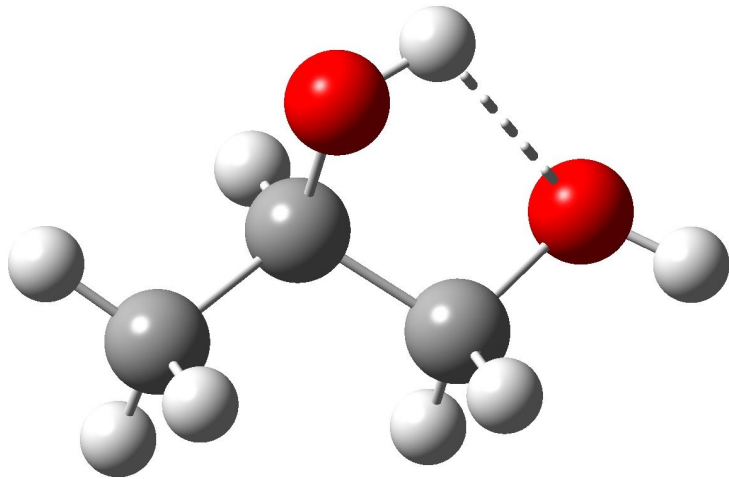


**Пептид ((GPH)<sub>3</sub>)<sub>10</sub> (глицин, пролин, гидроксипролин)**

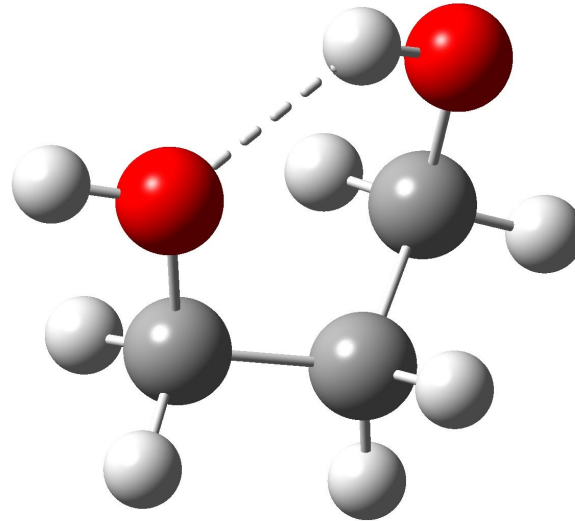
---

# Молекулярные модели просветляющих агентов

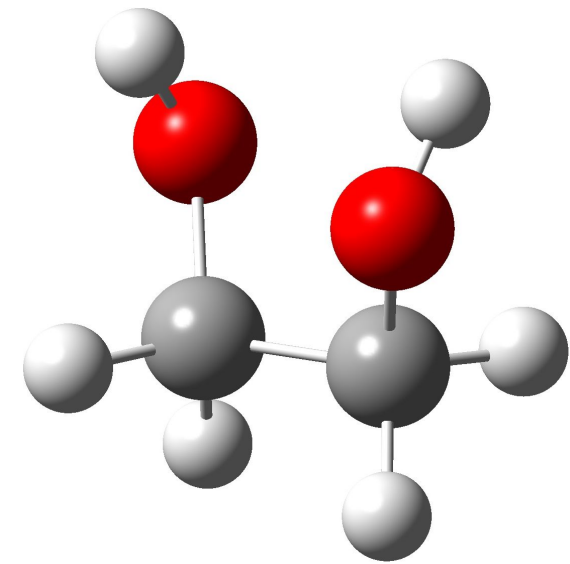
---



**1,2-пропандиол**



**1,3-пропандиол**

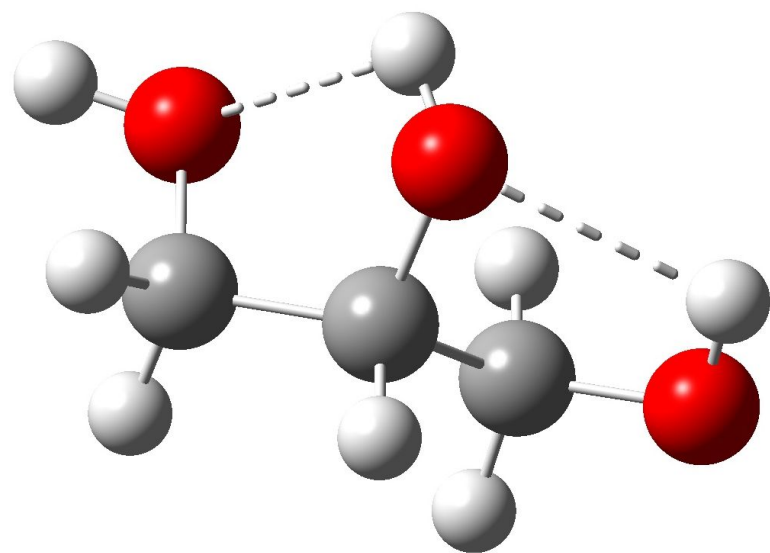


**Этиленгликоль**

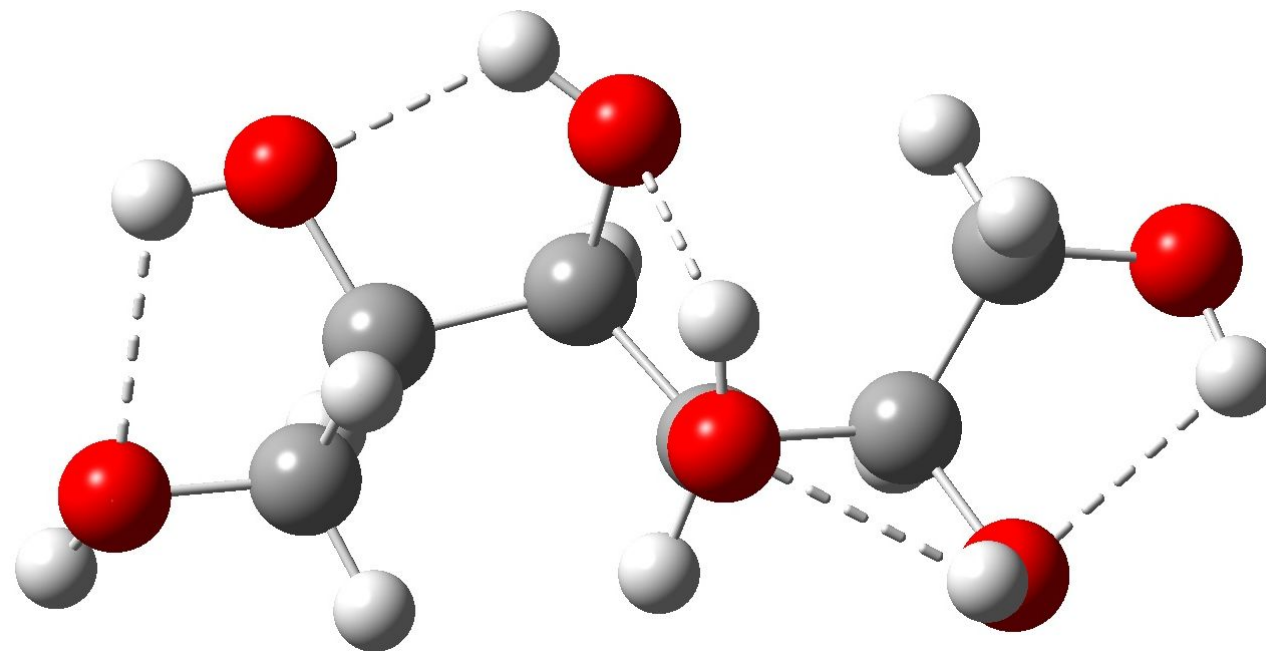
---

# Молекулярные модели просветляющих агентов

---



**Глицерин**

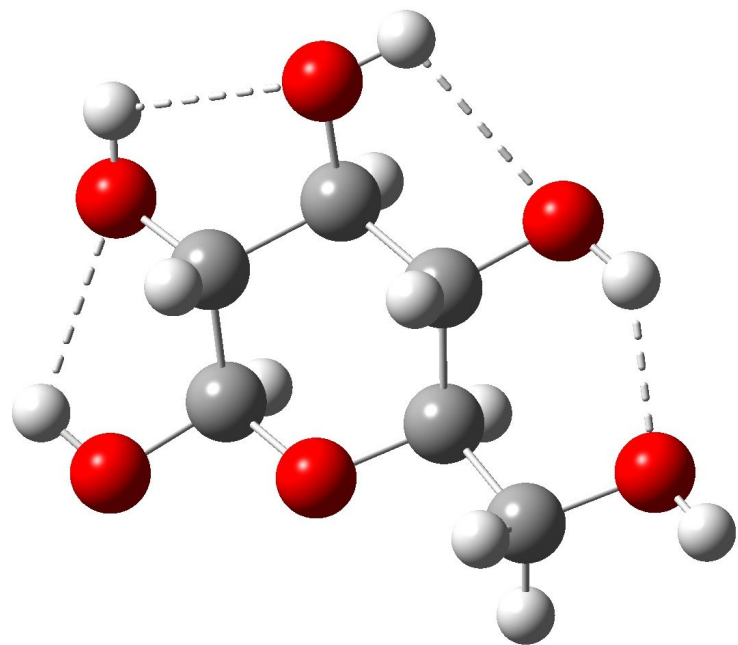


**Сорбитол**

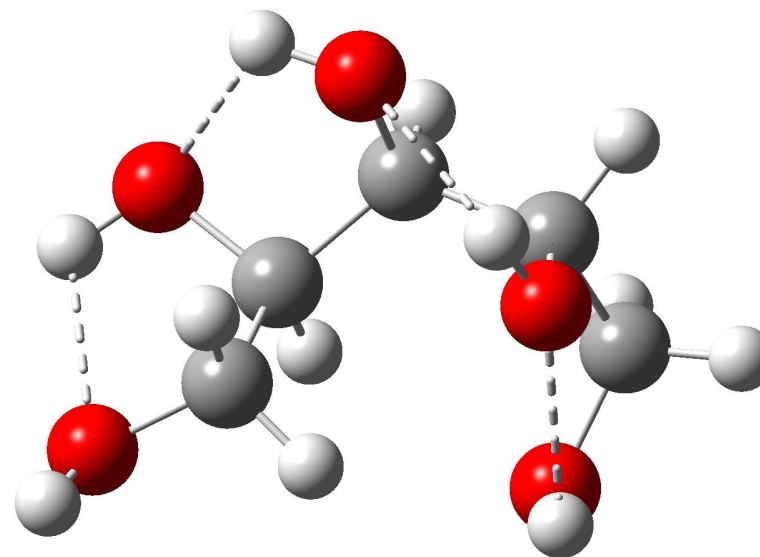
---

# Молекулярные модели просветляющих агентов

---



**Глюкоза**

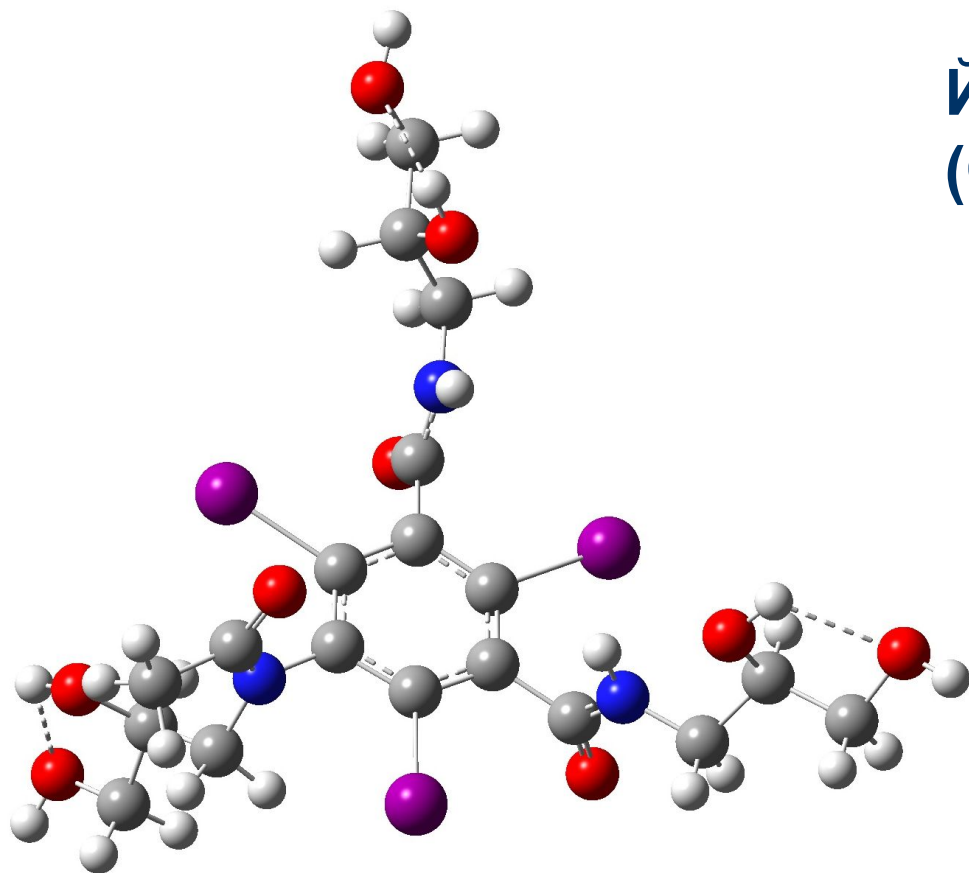


**Ксилитол**

---

# Молекулярные модели просветляющих агентов

---

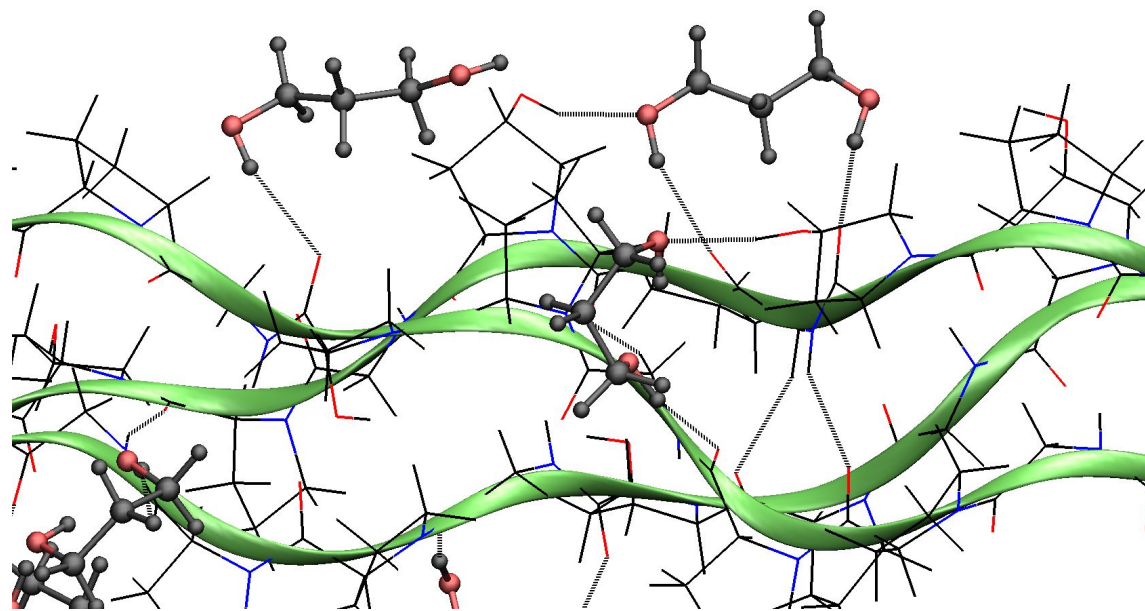


**Йогексол  
(Омнипак)**

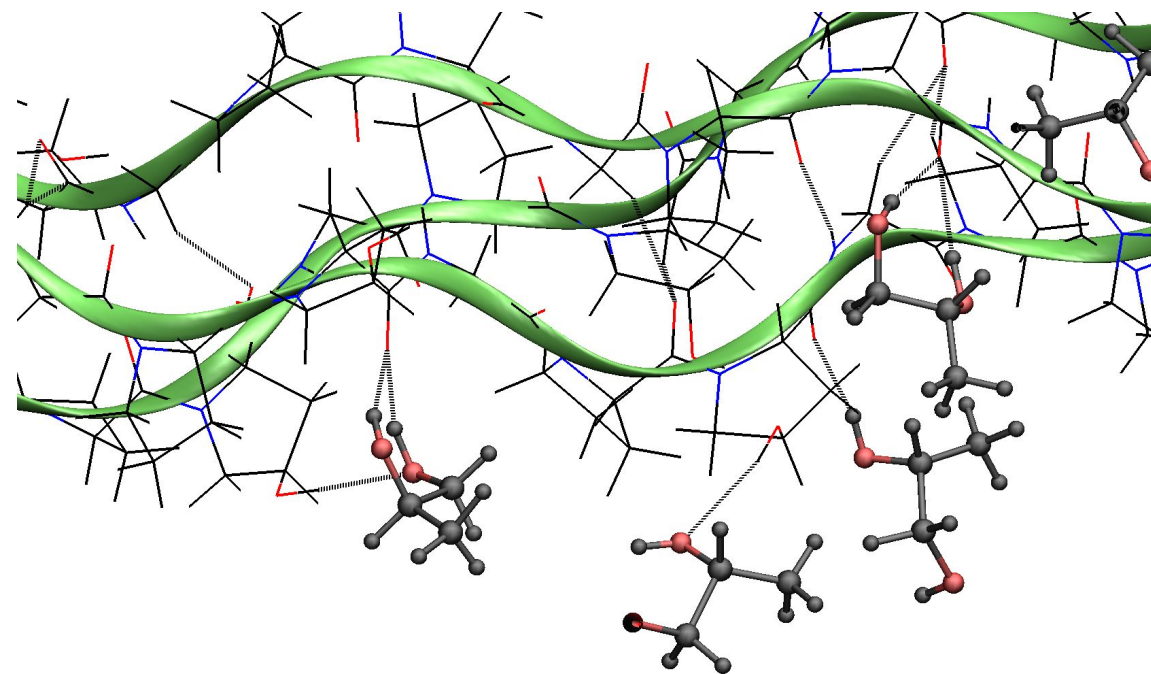
---

# Межмолекулярное взаимодействие

---



**Пептид ((GRP)<sub>3</sub>)<sub>10+1,3</sub>  
пропандиол**



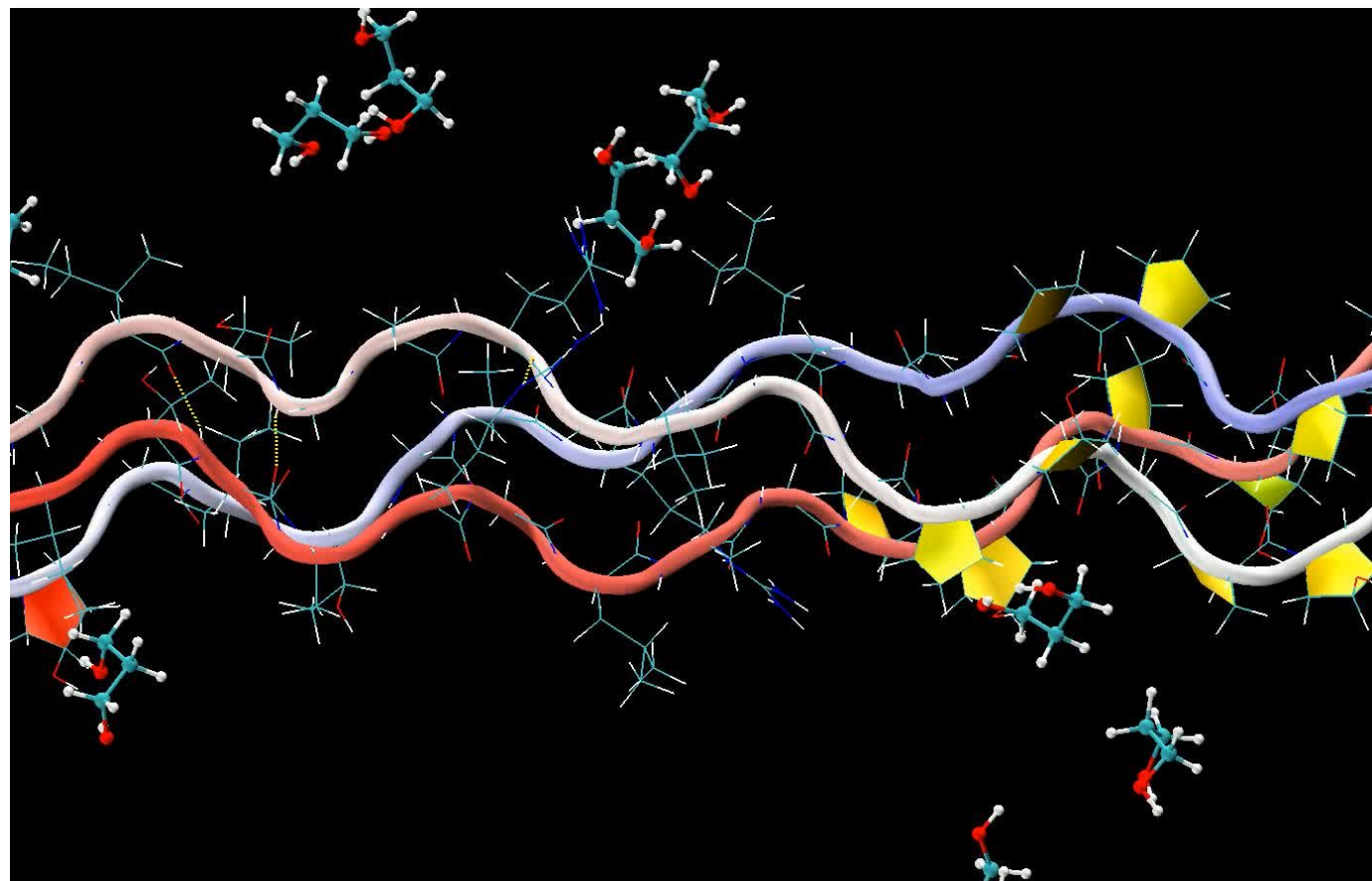
**Пептид ((GRP)<sub>3</sub>)<sub>10+1,2</sub>  
пропандиол**

---

# Межмолекулярное взаимодействие

---

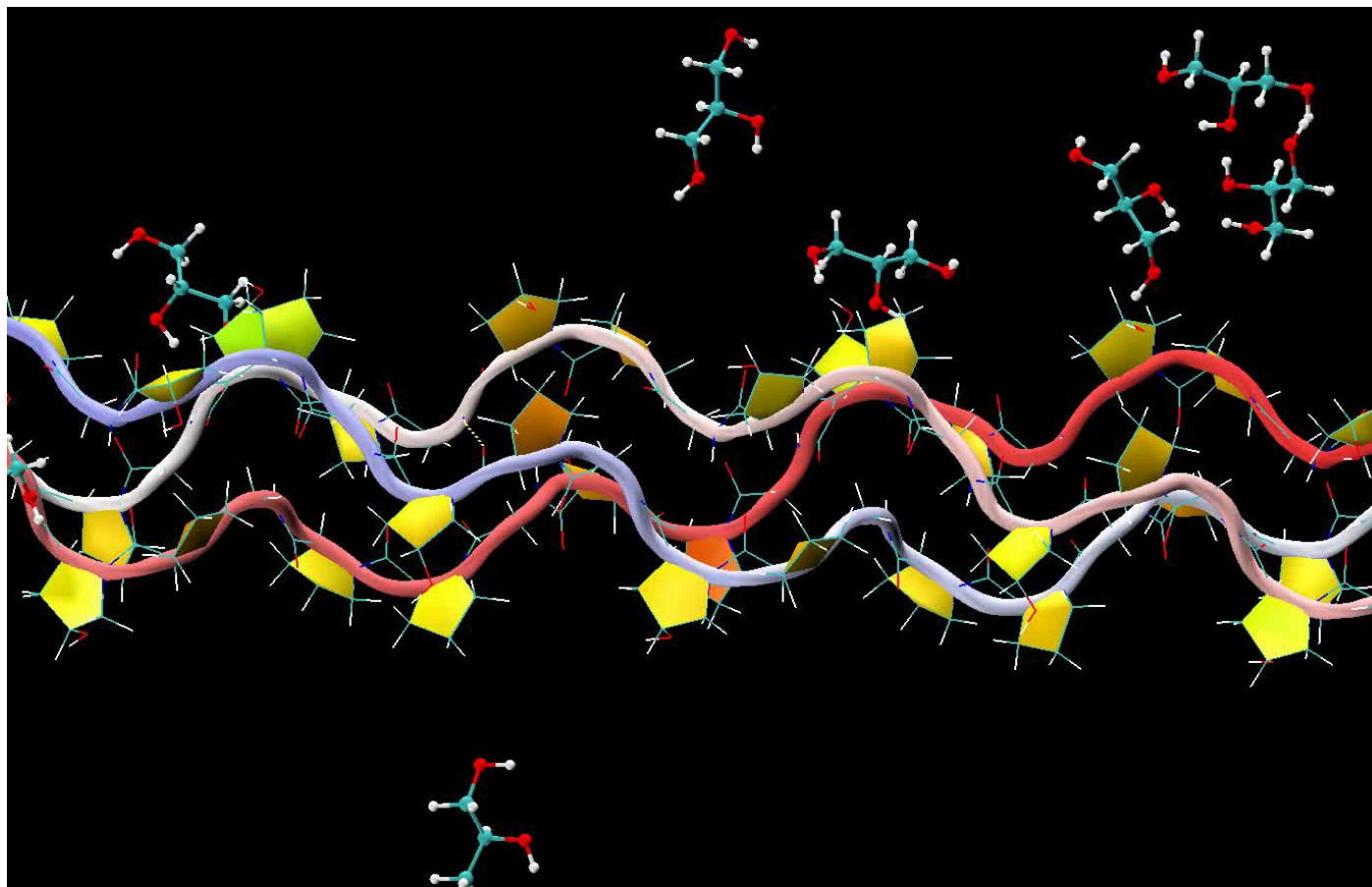
Пептид 1VKV+1,3 пропандиол



# Межмолекулярное взаимодействие

---

Пептид  
 $((\text{GRH})_3)_{10}$ +глицерин

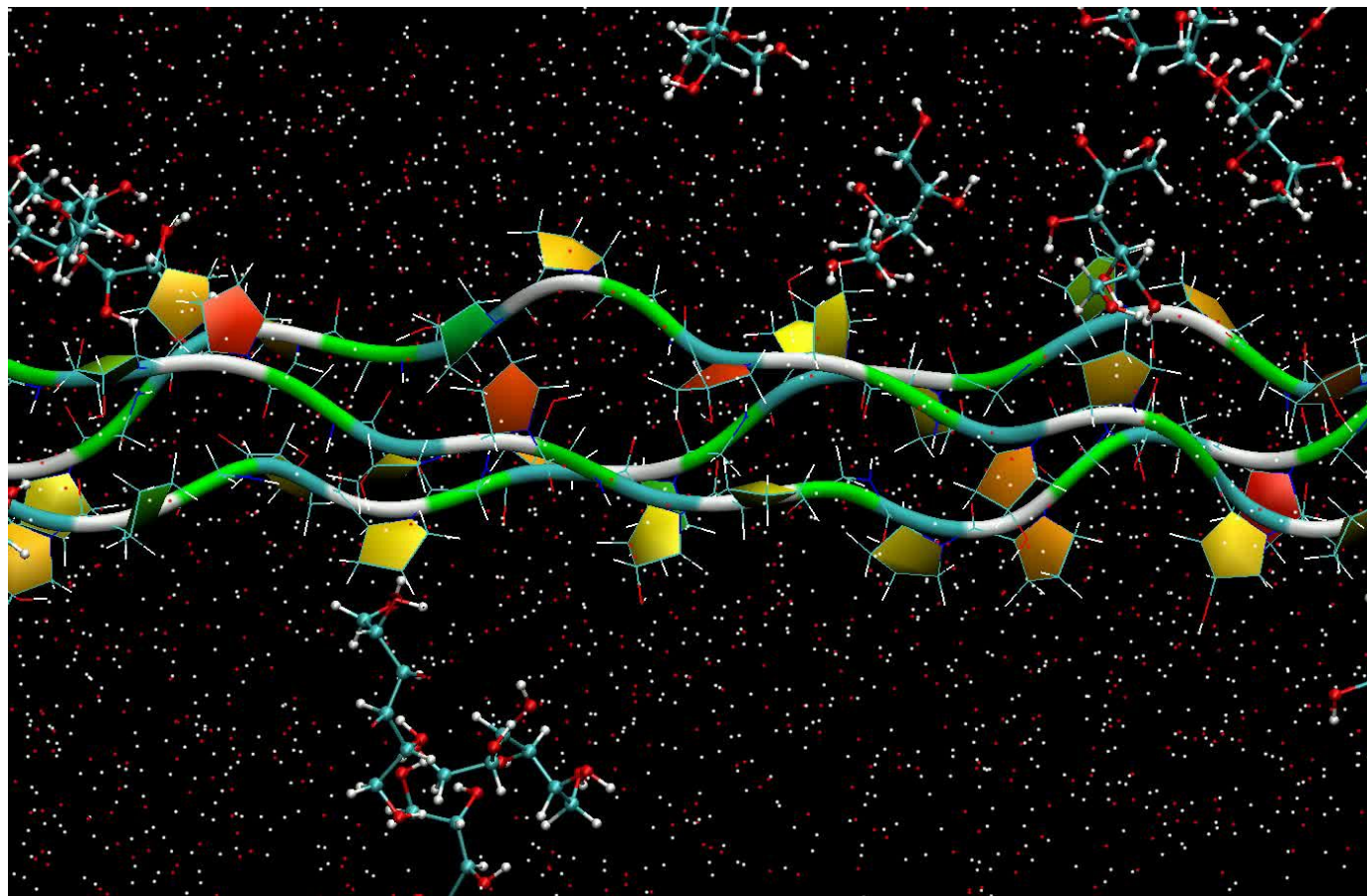




# Межмолекулярное взаимодействие

---

Пептид  
 $((\text{GRH})_3)_{10}$  + сорбитол + вода

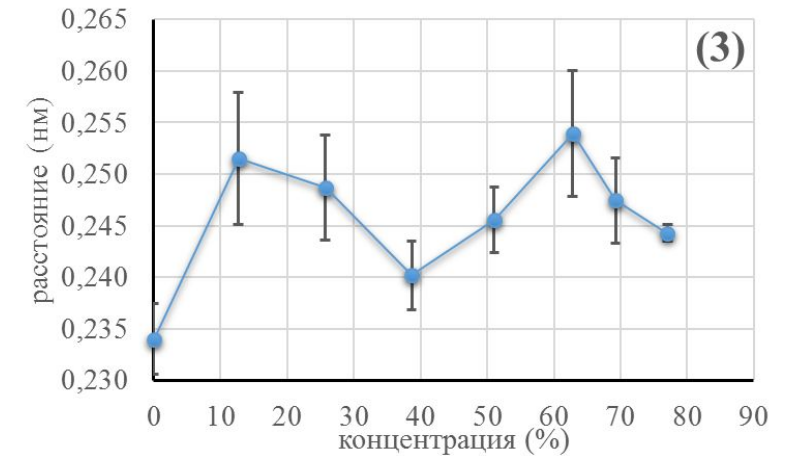
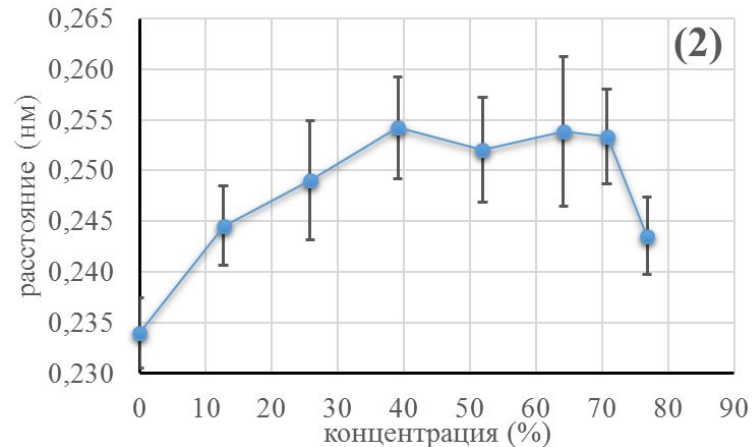
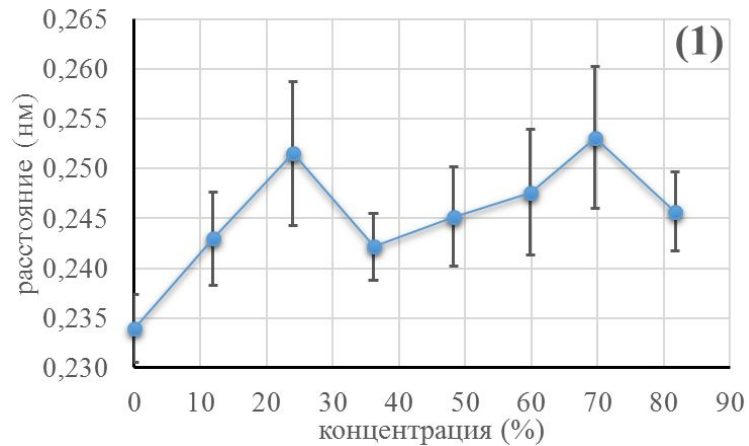


# Результаты молекулярного моделирования

| Аминокислотный остаток |                    | Занятость (%) |                |                |
|------------------------|--------------------|---------------|----------------|----------------|
| Название (сокращение)  | Кол-во в коллагене | 1,2-этандиол  | 1,2-пропандиол | 1,3-пропандиол |
| Глицин (GLY)           | 27                 | 17.5          | 14.8           | 15.5           |
| Гидроксипролин (HYP)   | 27                 | 47.0          | 52.3           | 53.4           |
| Пролин (PRO)           | 27                 | 1.8           | 1.2            | 1.4            |
| <b>Всего:</b>          |                    | <b>66.4</b>   | <b>68.3</b>    | <b>70.3</b>    |

| Просветляющие агенты | Время занятости (%) для коллагенов |                      | Потенциал оптического просветления [1] |
|----------------------|------------------------------------|----------------------|--|
|                      | $((GPH)_3)_9$                      | $((GPH)_3)_{10} [1]$ |  |
| 1,2-этандиол         | 66.35                              | 73.43                | 0.1826                                 |
| 1,2-пропандиол       | 68.32                              | 75.30                | 0.1831                                 |
| 1,3-пропандиол       | 70.34                              | 76.56                | 0.3221                                 |

# Результаты молекулярного моделирования



На графиках представлены зависимости среднего расстояния (в нм) между остовными группами различных  $\alpha$ -цепей коллагена от массовой доли (в %) молекул 1,2-этандиола – (1), 1,2-пропандиола – (2) и 1,3-пропандиола – (3). Вертикальными черточками обозначен уровень стандартной ошибки полученных арифметических средних.

# Выводы

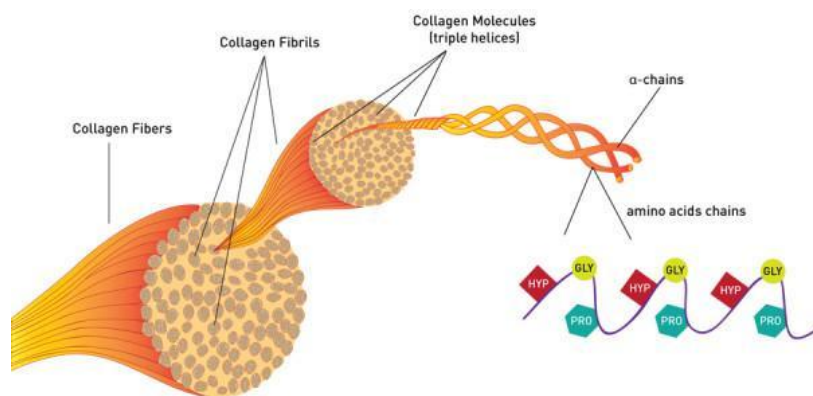
---

Анализ данных, представленных на рис.6 показывает, что влияние молекул двухатомных спиртов на регулярную структуру коллагена, по сравнению с растворителем (водой), составляет в среднем 6.0% (что соответствует 0.017 нм). Для 1,2-этандиола это значение составляет 5.5%, для 1,2-пропандиола – 6.9% и для 1,3-пропандиола – 5.7%, соответственно. В данном случае отсутствует прямая корреляция между средней величиной изменения расстояния между альфа цепями коллагена и потенциалом оптического просветления. Тем не менее в результате компьютерного моделирования получен на наш взгляд важный результат который состоит в том, что добавление в окружающую коллаген среду двухатомных спиртов приводит к ослаблению гидратной оболочки молекул коллагена, которая оказывает на структуру коллагена стабилизирующее действие [29]. Таким образом можно заключить, что добавление в водное окружение коллагена двухатомных спиртов приводит к определенному изменению геометрических размеров молекул коллагена, что, может сказываться на показателе преломления и как следствие на оптическом просветлении биоткани.

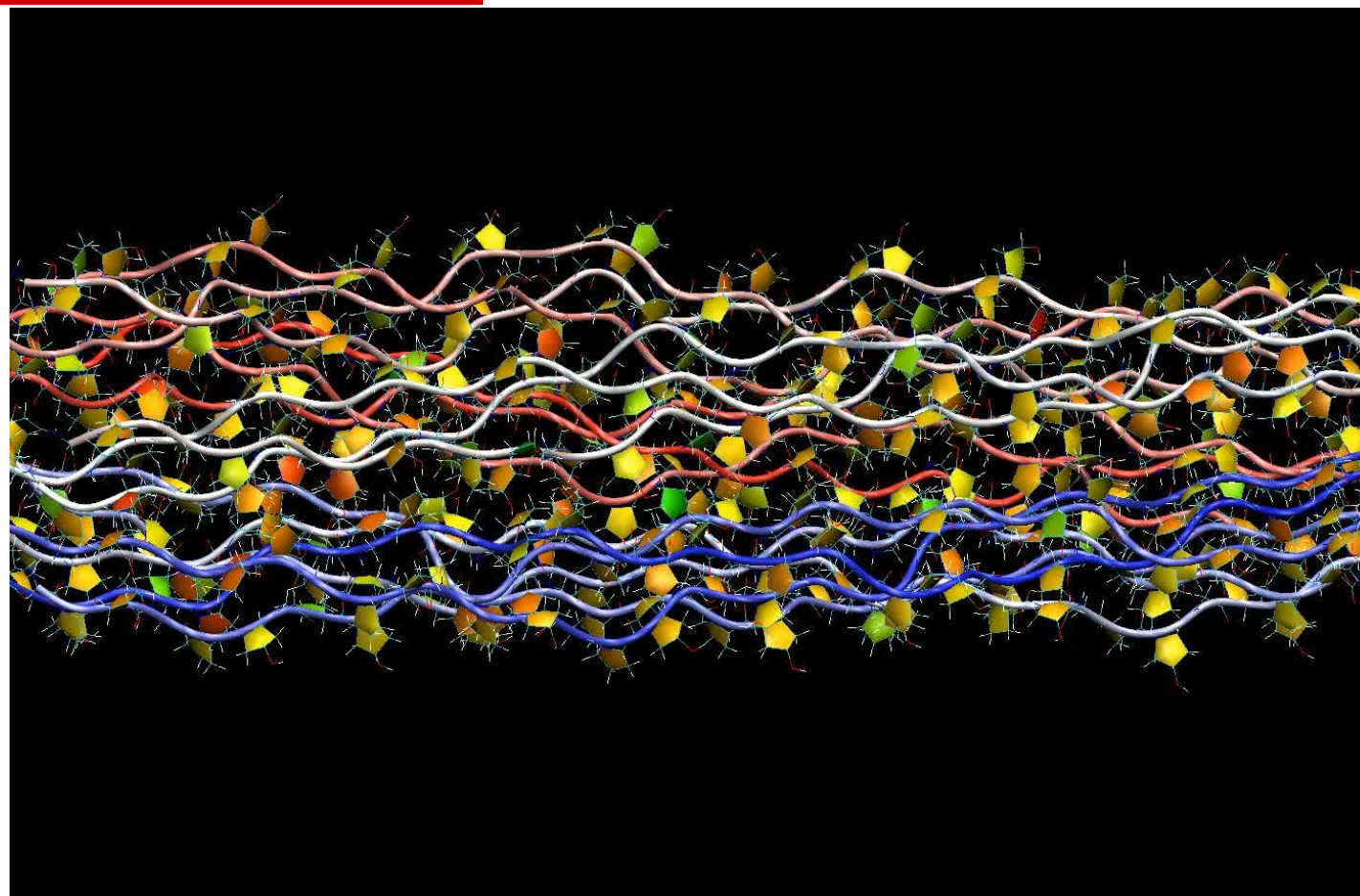
---

# Дальнейшие исследования

## Молекулярная модель коллагеновой микрофибриллы



**15 Пептидов  
((GPH)3)10**



# Модель описания рассеяния света в биотканях

---

Для описания рассеяния света в биотканях обычно используется модель, в которой биоткань представляется в виде одного или нескольких плоскопараллельных слоев, образованных хаотично расположенными частицами-рассеивателями, погруженными в изотропное базовое вещество (внутриканевую жидкость). При проведении расчетов рассеиватели, как правило, представляются либо как сферические, либо как бесконечно длинные цилиндрические частицы. В последнем случае обычно предполагается, что цилиндры расположены параллельно поверхности слоя. Теория рассеяния света биотканями базируется на теории рассеяния света Ми и ее различных приближениях (например, приближении Рэля-Ганса-Дебая).

В рамках данной модели, в качестве количественной характеристики светорассеяния используется понятие коэффициента рассеяния. Коэффициент рассеяния имеет вид:

$$\mu_s = N\sigma_s, \quad (1)$$

где  $\mu_s$  – коэффициент рассеяния,

$\sigma_s$  – сечение рассеяния и

$N$  – число рассеивающих частиц в единице объема биоткани (для сферических частиц).

В случае представления рассеивателей в виде бесконечно длинных диэлектрических цилиндров  $N$  это число цилиндров на единицу площади поперечного сечения биоткани.

---

В первом случае  $N = 3\phi / (4\pi r^3)$ , а во втором  $N = \phi / (\pi r^2)$ . Здесь  $\phi$  – объемная доля рассеивателей, и  $a$  – радиус рассеивающей частицы.