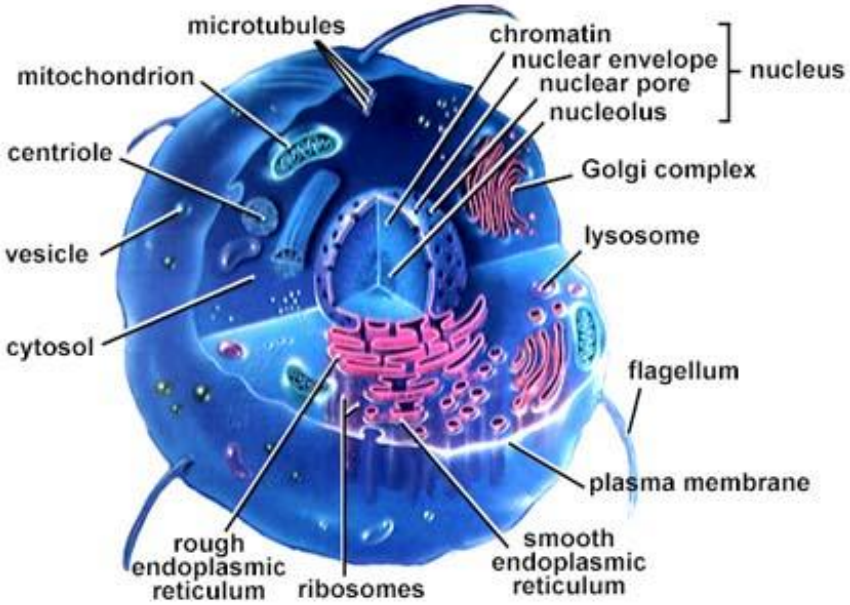
Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

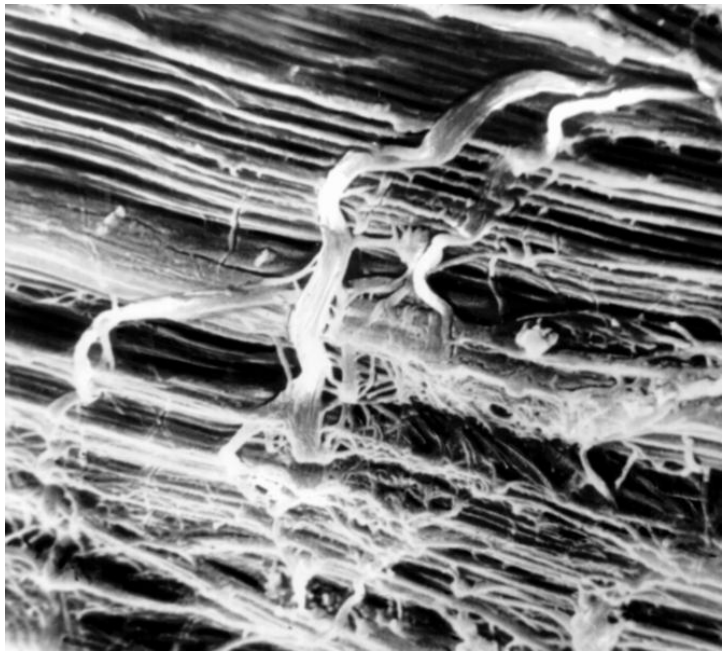
Оптическое просветление биотканей

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

Оптическое просветление биотканей



животная клетка

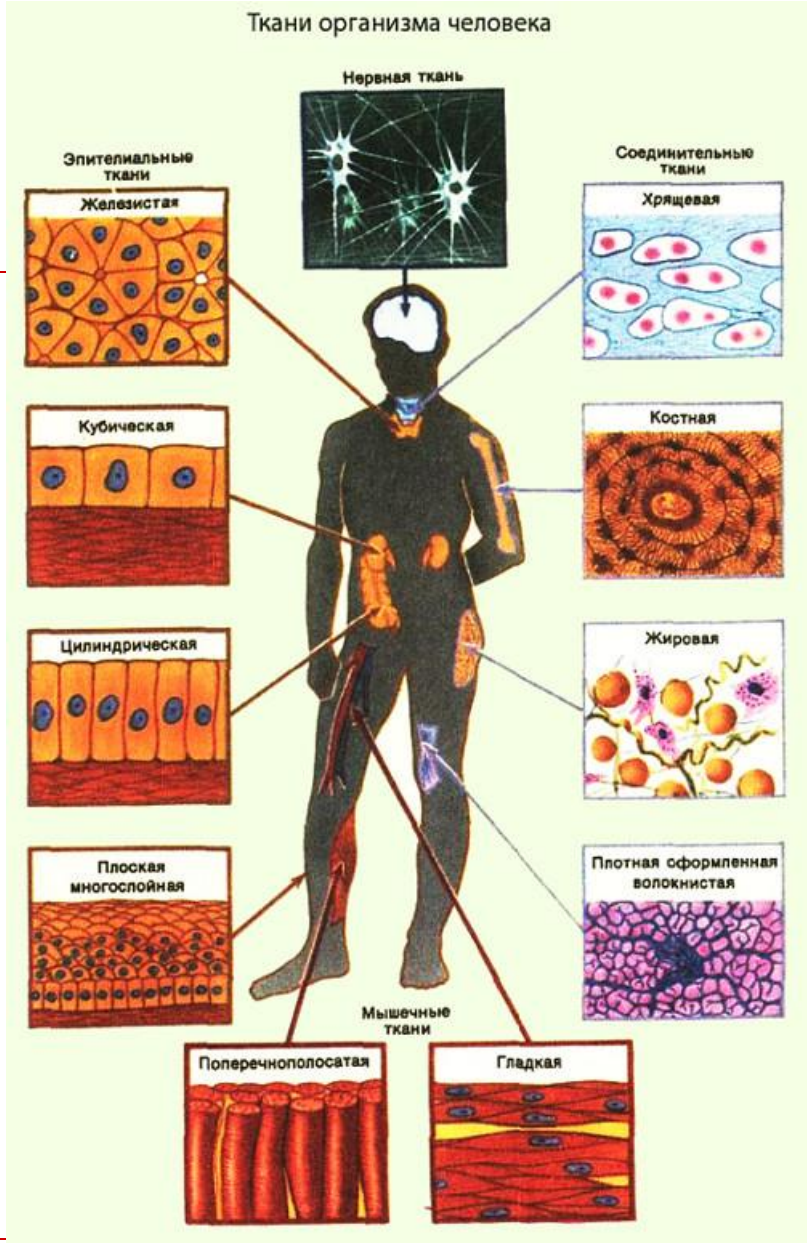


фиброзная ткань

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

Введение

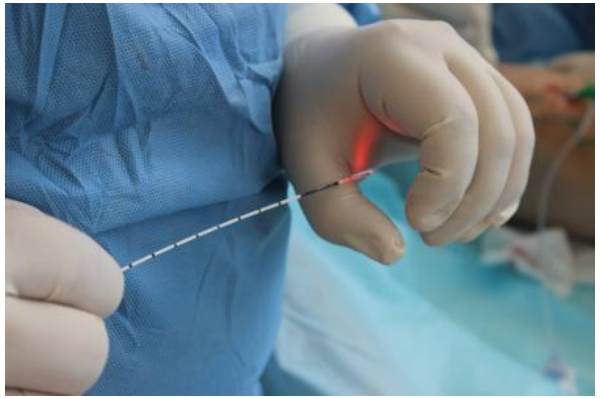
Знание оптических параметров биологических тканей является принципиально важным для разработки оптических моделей биологических тканей, дозиметрии лазерного излучения при планировании хирургических и терапевтических процедур и проведении диагностики различных заболеваний с использованием оптических методов.



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 не значительной интенсивности абсолютно безвредно.



Световоды и лазеры в медицине

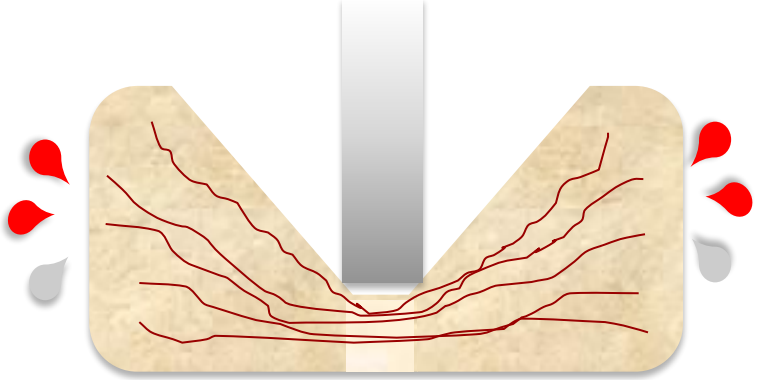
Методы и механизмы оптического просветления

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

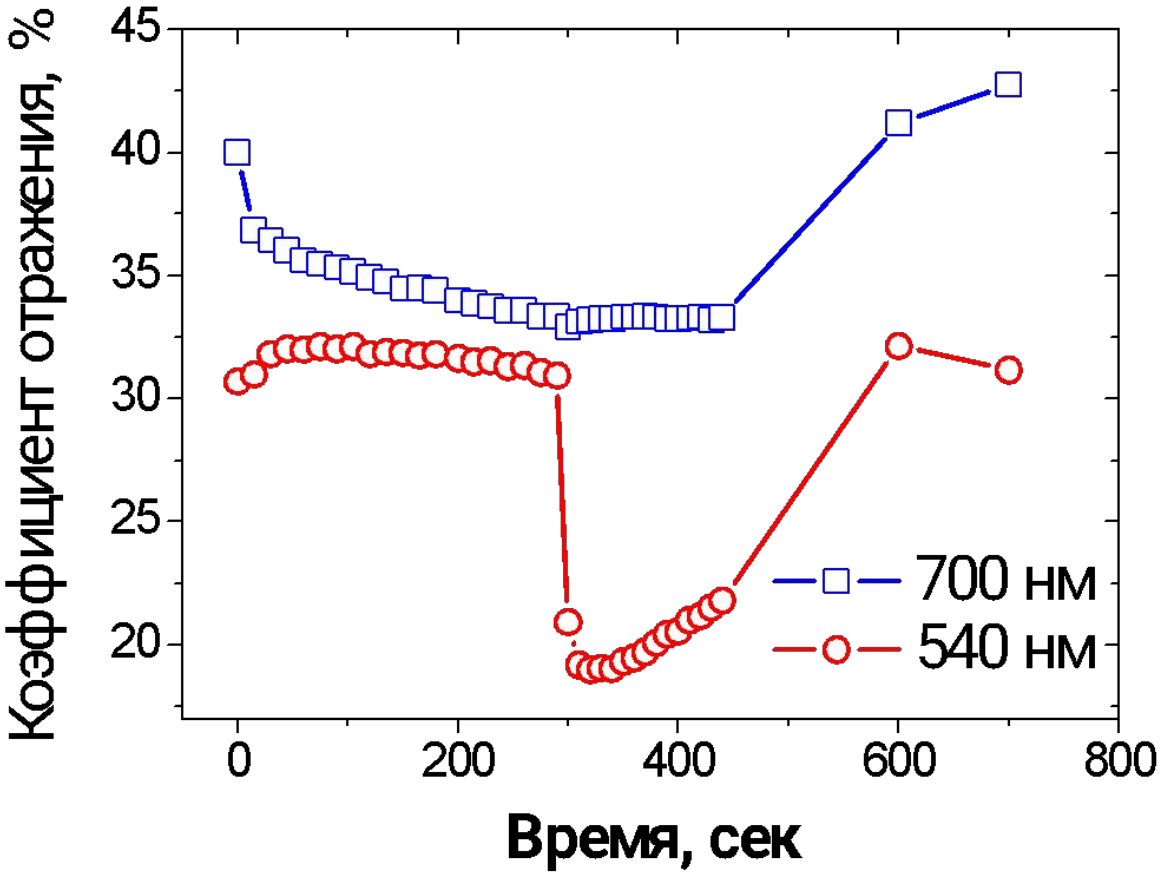
Компрессия

Увеличение прозрачности ткани происходит за счет увеличения:

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



Компрессия

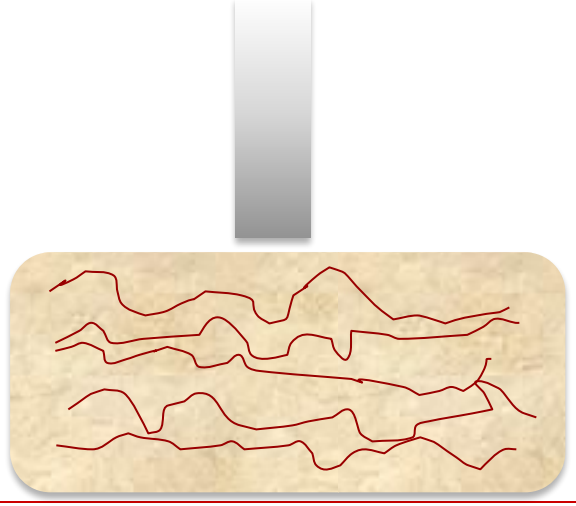


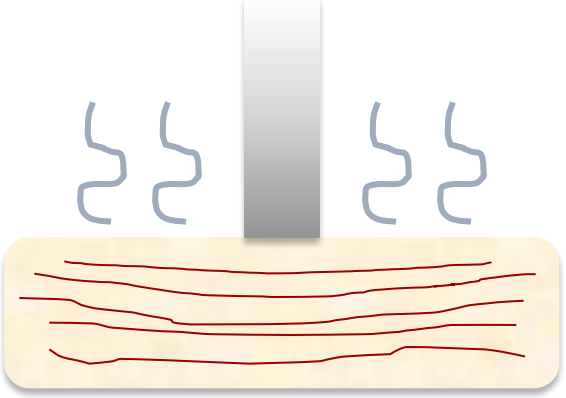
Кинетика спектров отражения кожи человека *in vivo*, измеренные на двух длинах волн в условиях внешней механической компрессии (интервал времени 0-290 сек) и при ее снятии (интервал времени свыше 290 сек)

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.

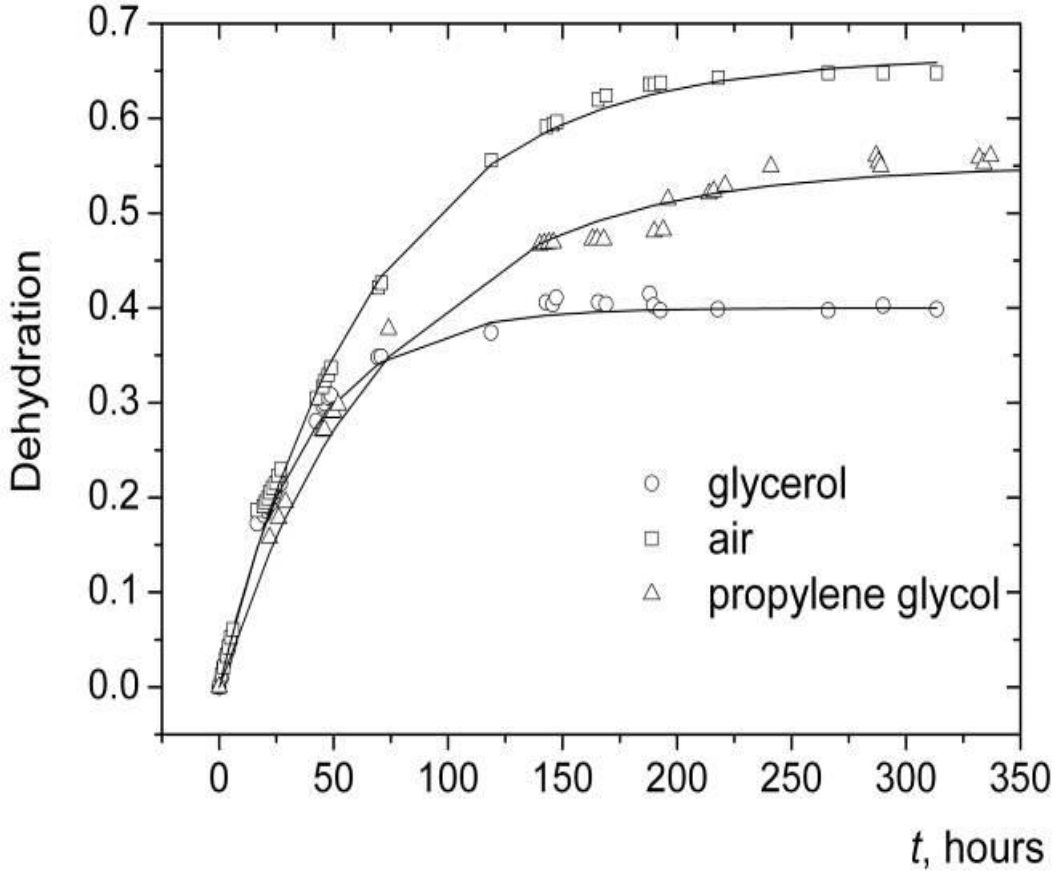
Оптическая иммерсия

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.

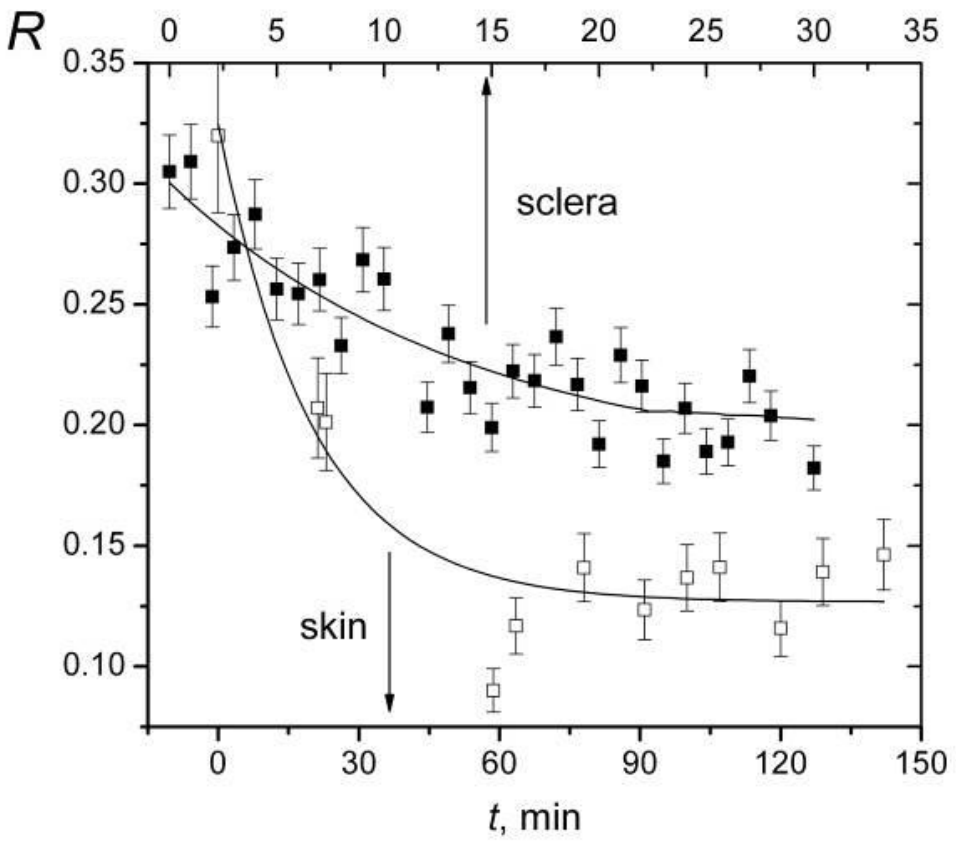
Оптическая иммерсия

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

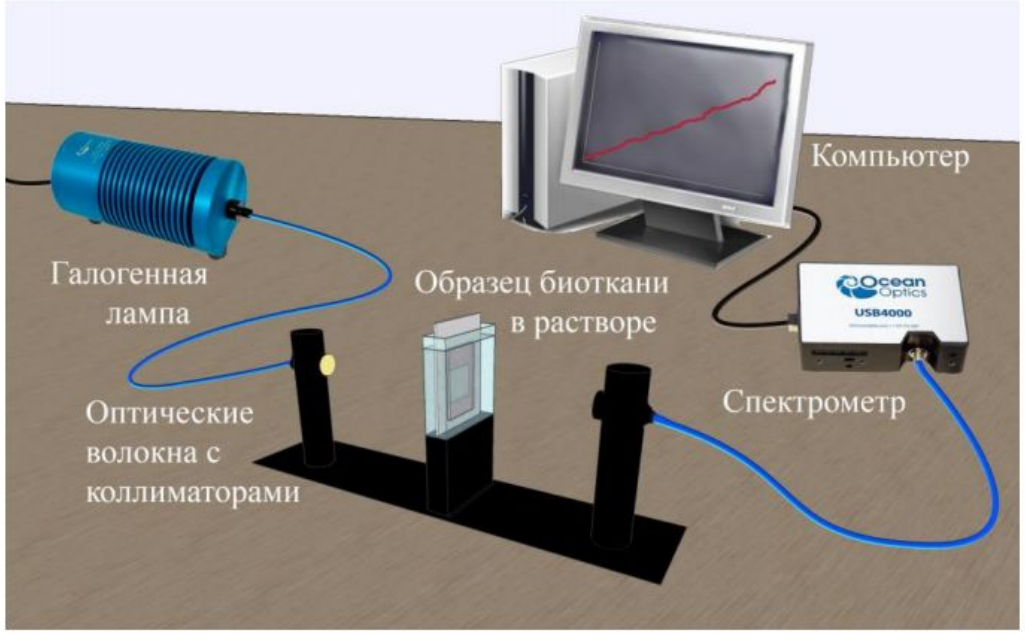
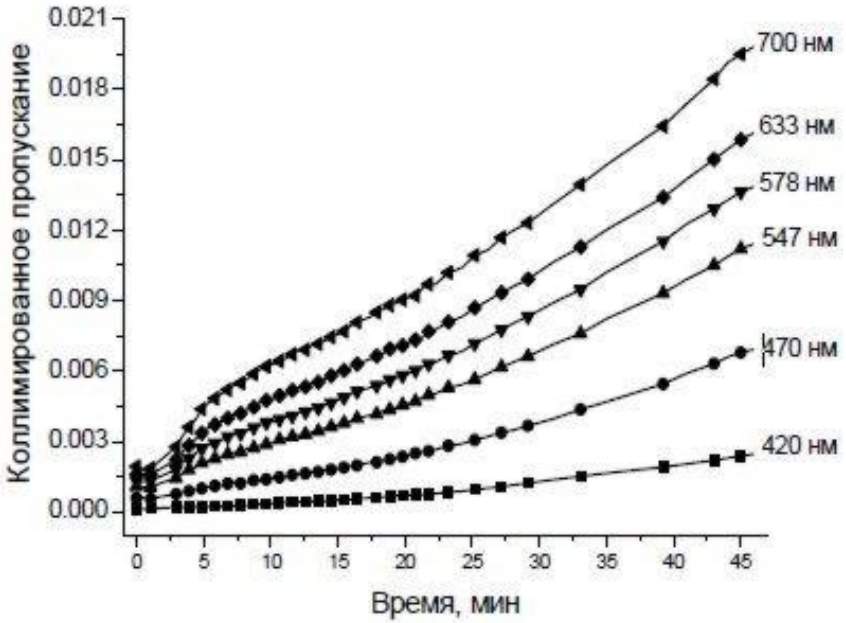
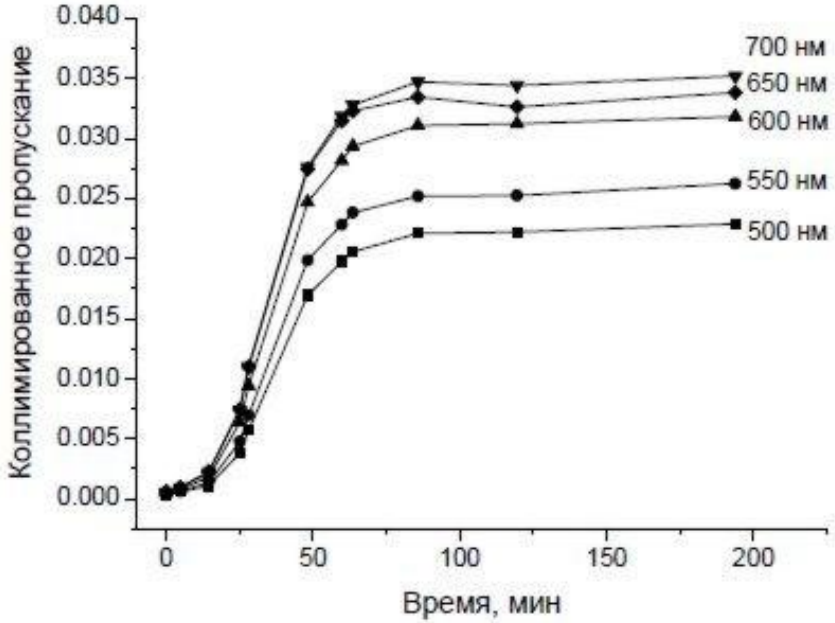


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца биоткани, включающая в себя галогенную лампу HL-2000, оптические волокна с коллиматорами, кювету с образцом на пластиковой пластине, погруженной в раствор, многоканальный спектрометр USB4000-VIS-NIR и компьютер

Оптическая иммерсия



Динамика изменения коллимированного пропускания образца кожи помещенного в глицерин



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

Оптическая иммерсия

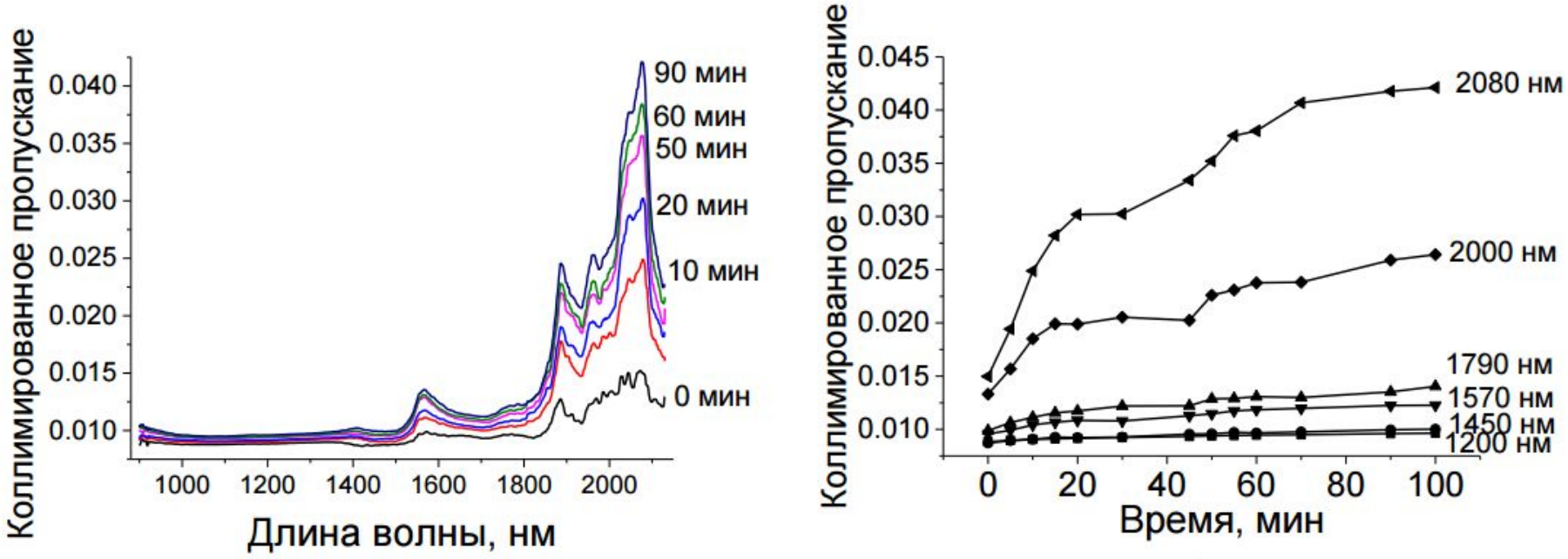
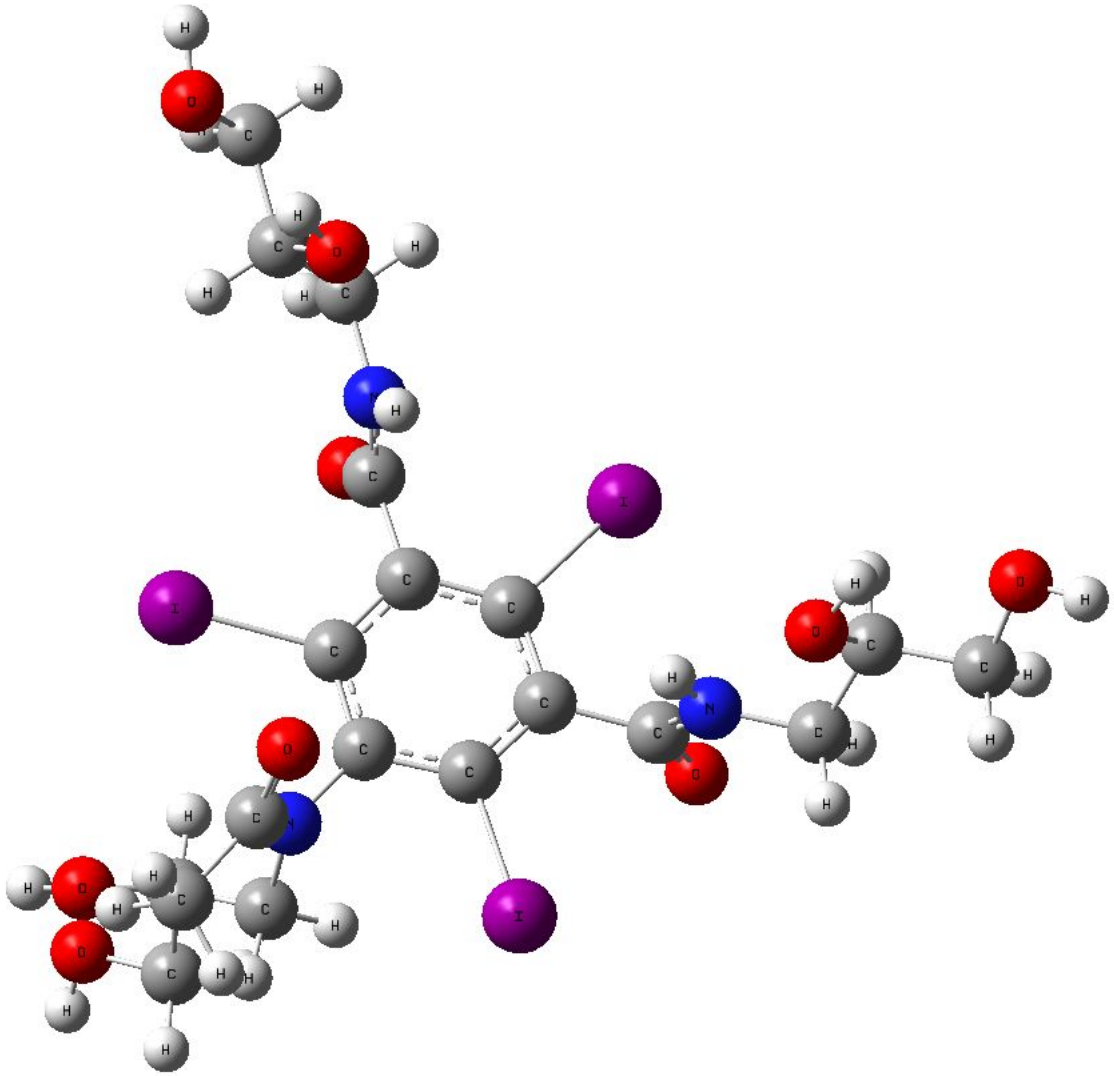


Рисунок 13. Спектры (а) и кинетика изменения (б) коллимированного пропускания образца кожи *ex vivo* помещенного в «Омнипак»

Оптическая иммерсия

Молекулярная строение молекулы йогексола (омнипак)

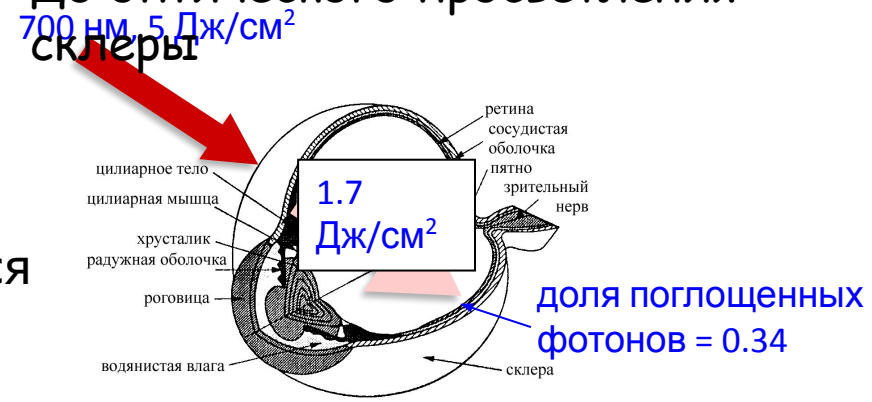


Применения метода оптического просветления биотканей

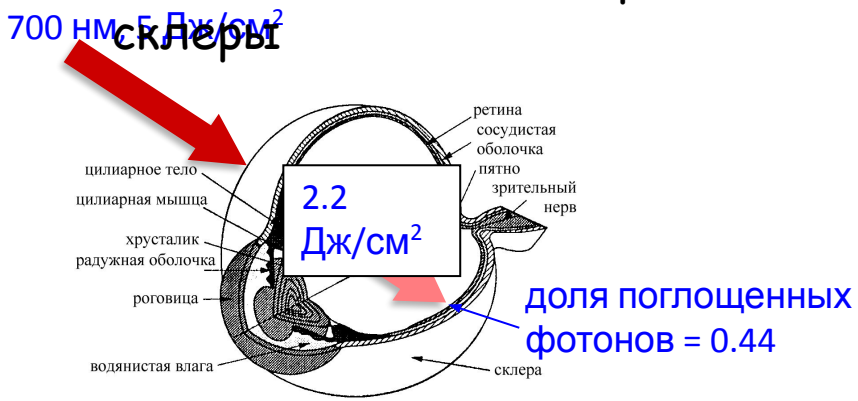
Трансклеральные лазерные операции

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

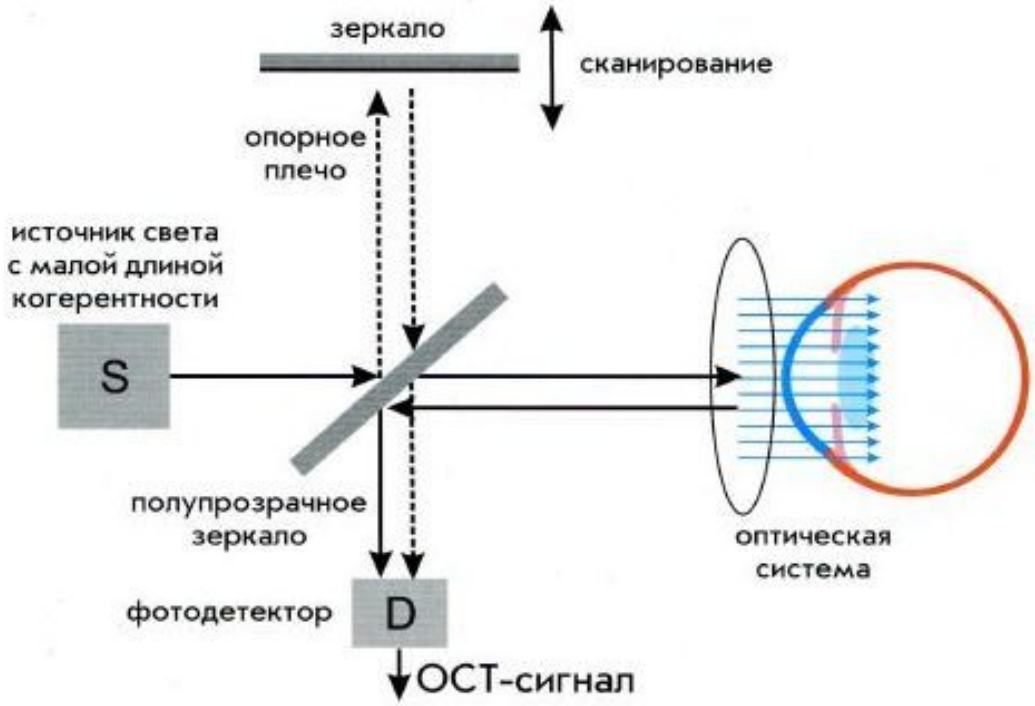


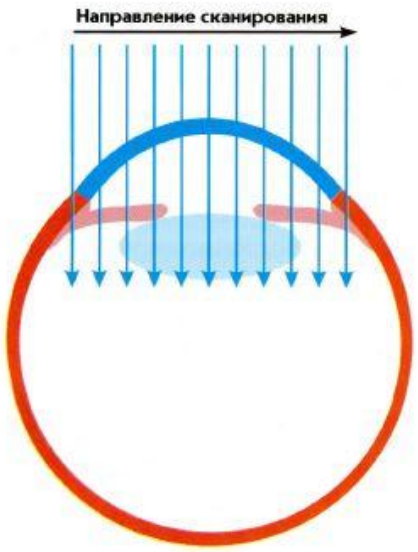
После оптического просветления склеры

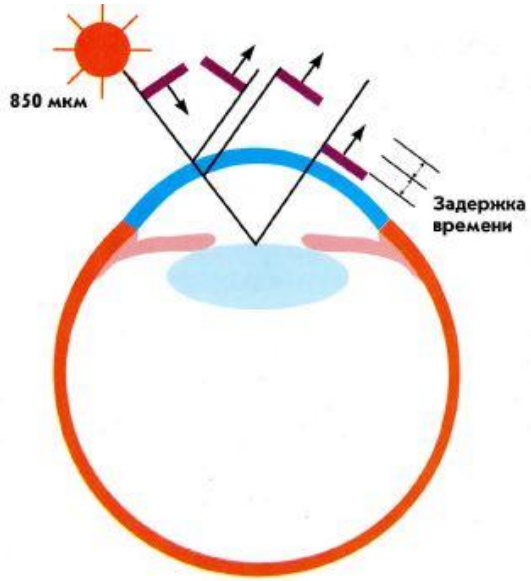


Применения метода оптического просветления биотканей

- Оптическая когерентная томография

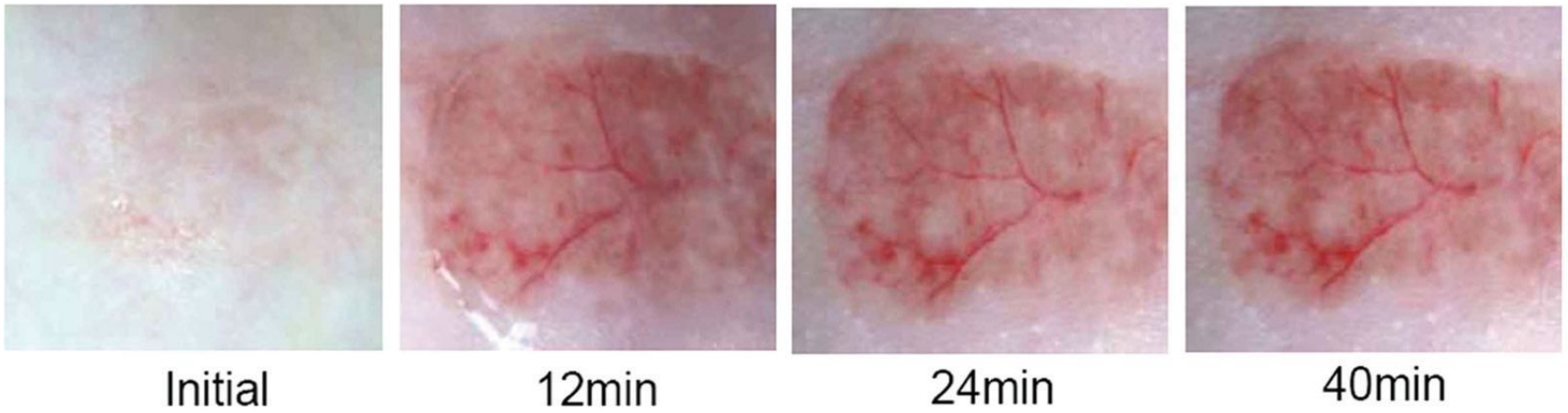


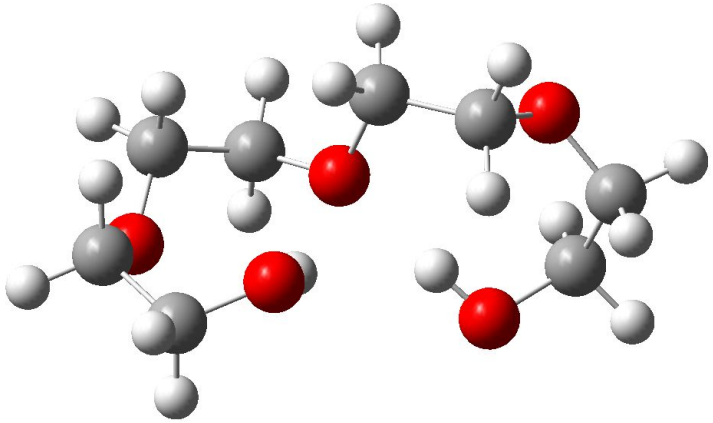




Применения метода оптического просветления биотканей

Улучшение визуализации подкожных кровеносных сосудов





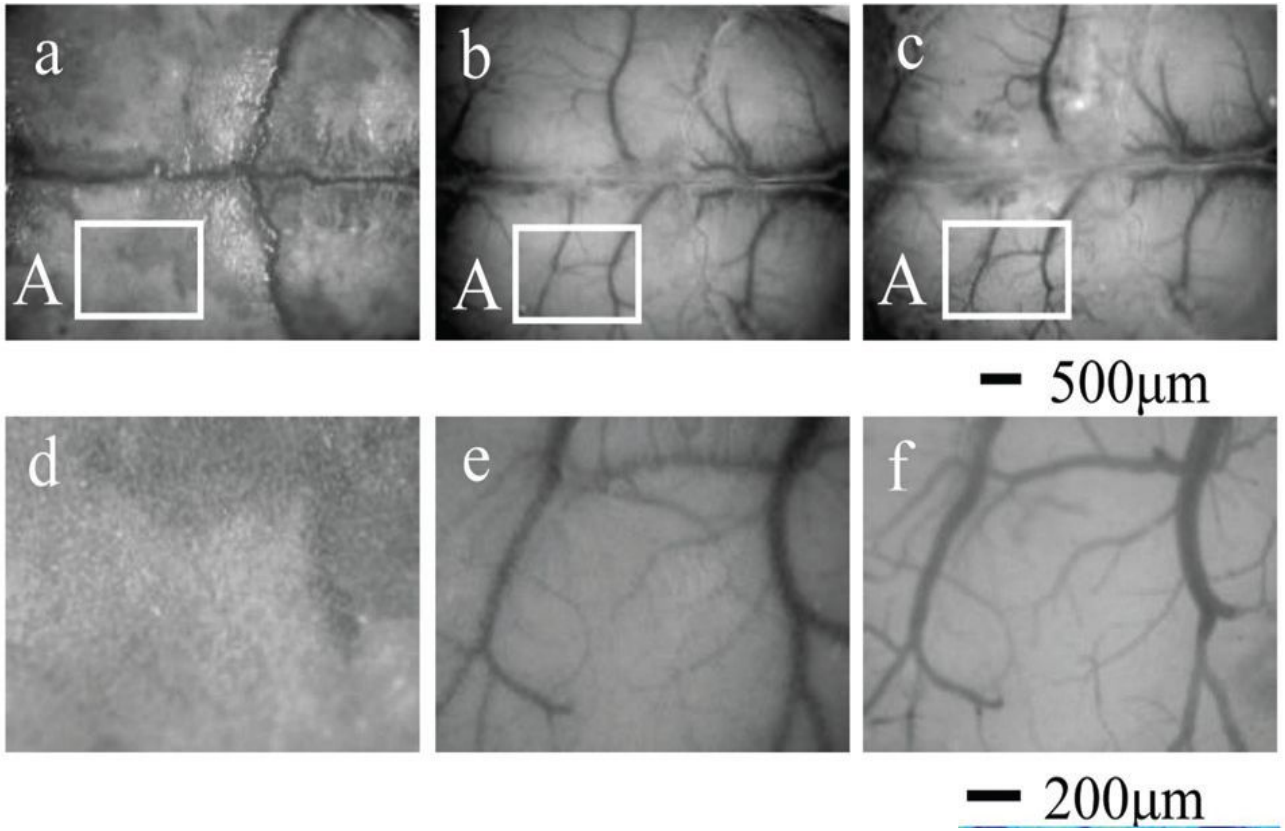
ПЭГ-200

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

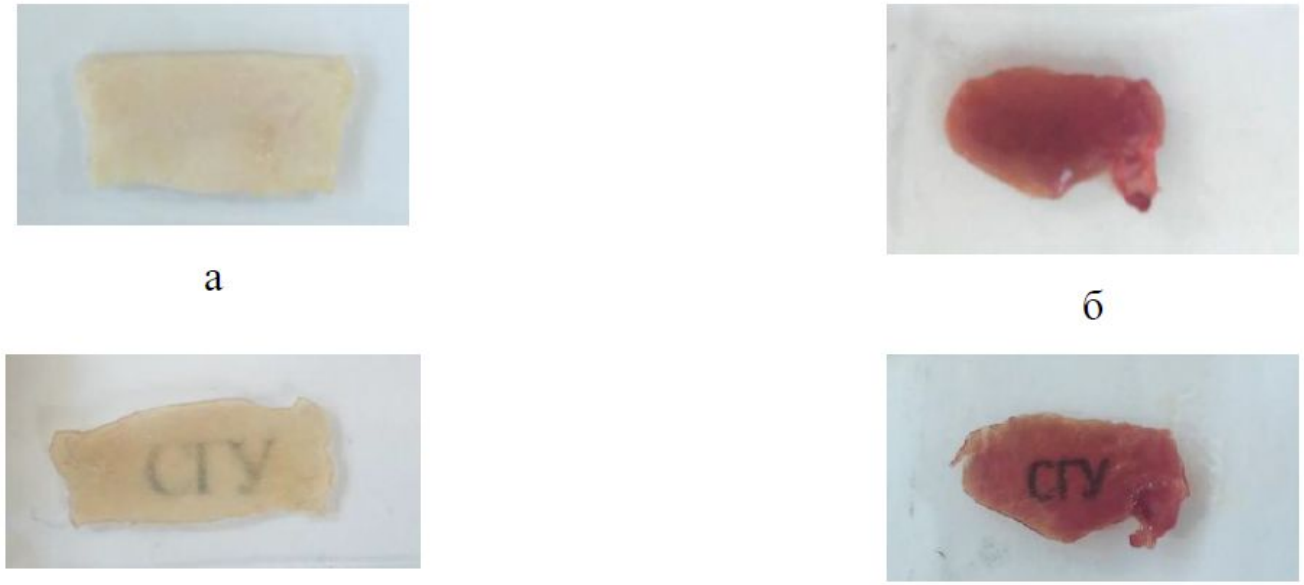


Рисунок 22. Изображения образцов кожи и сердечной мышцы до (а, б) и после (в, г) оптического просветления в 70%-растворе глицерина

Механизм оптического просветления

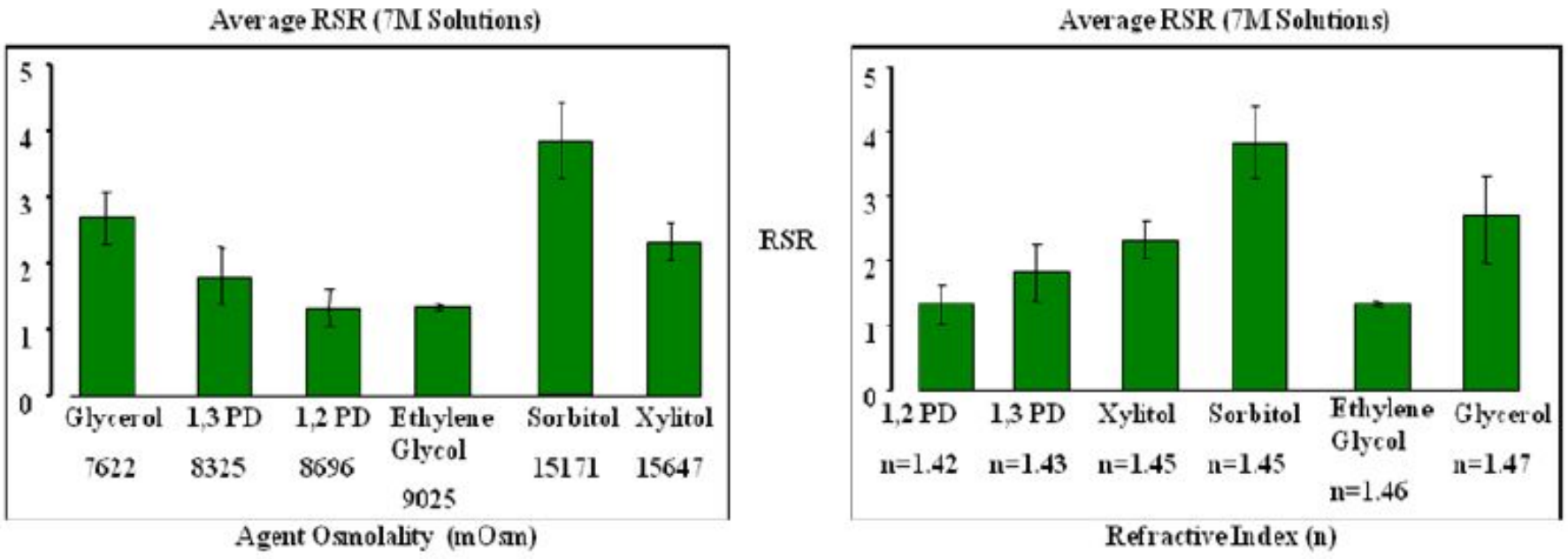


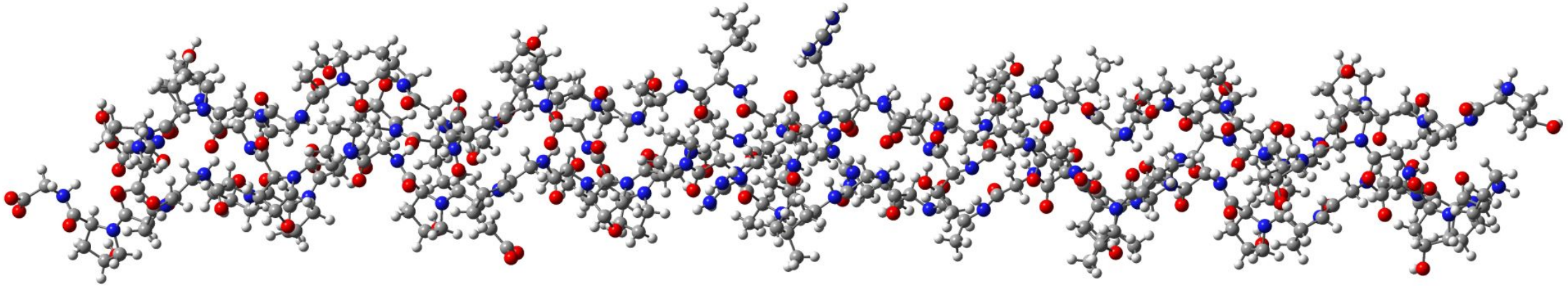
Figure 12: Skin clearing (RSR) does not correlate with osmolality or refractive index.

Механизм оптического просветления

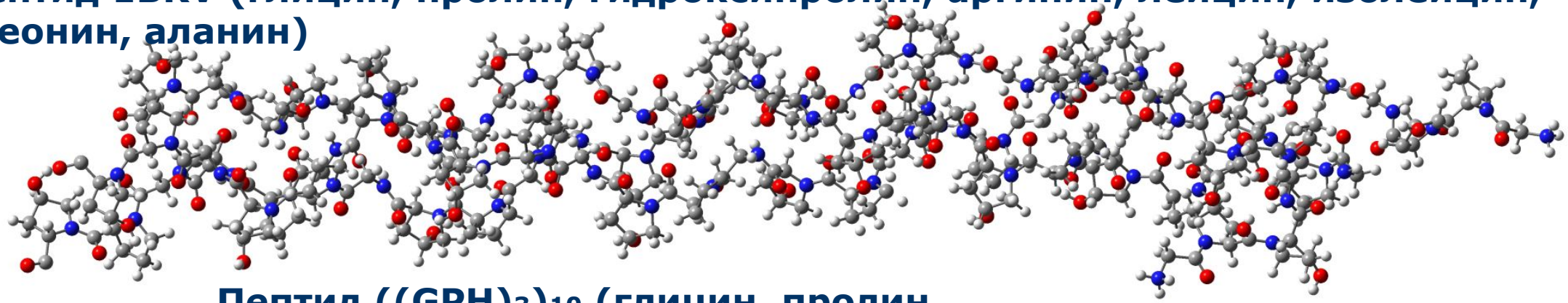
Table 6: Average number of hydrogen bonds and bridges formed.

Chemical	Hydrogen Bonds (#/ps)	Bridges (#/ps)
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

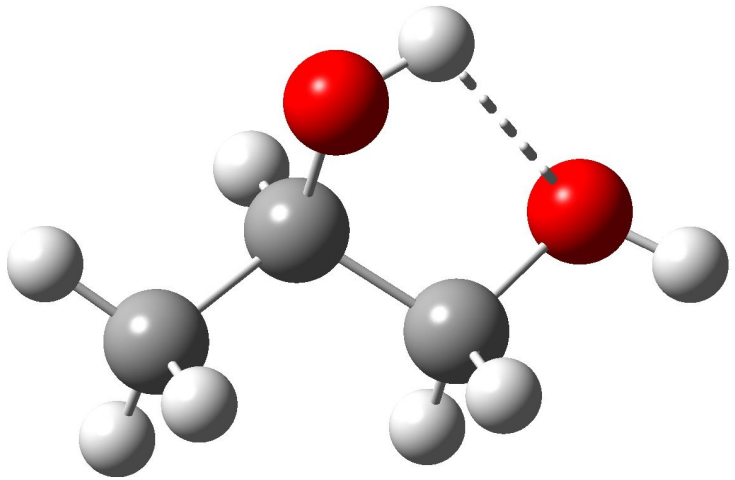


Пептид 1BKV (глицин, пролин, гидроксипролин, аргинин, лейцин, изолейцин, треонин, аланин)

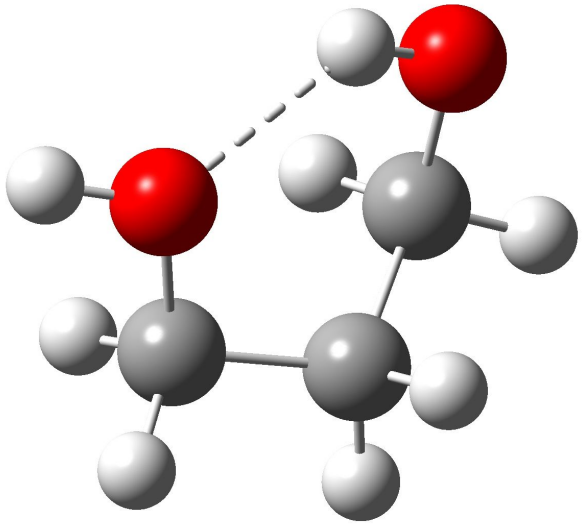


Пептид $((GPH)_3)_{10}$ (глицин, пролин, гидроксипролин)

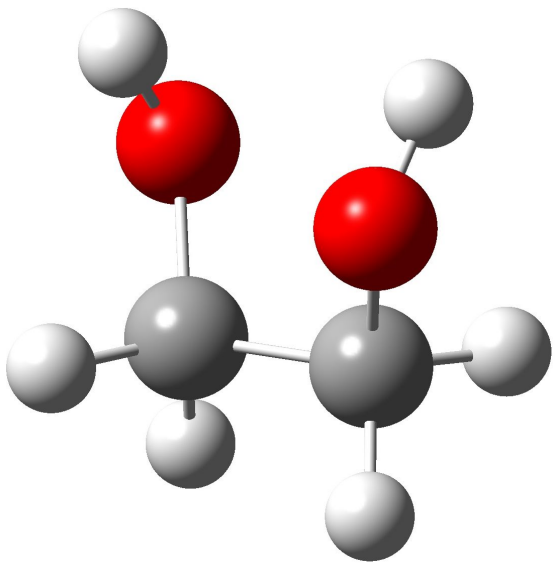
Молекулярные модели просветляющих агентов



1,2-пропандиол

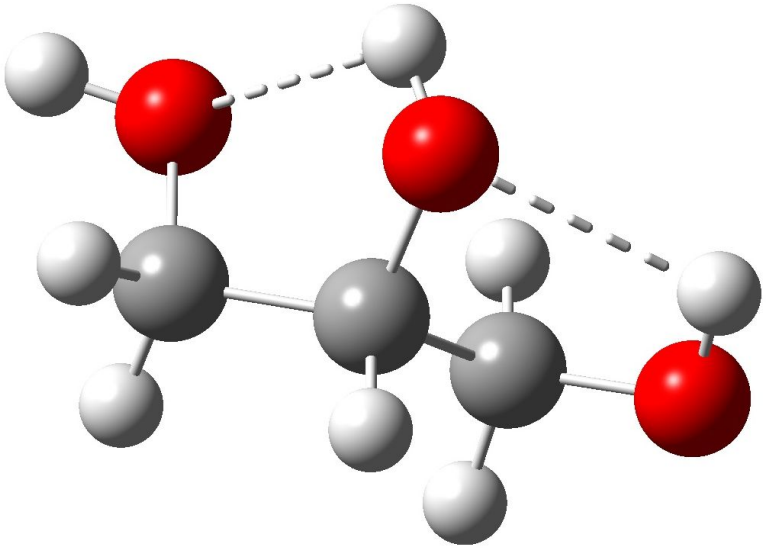


1,3-пропандиол

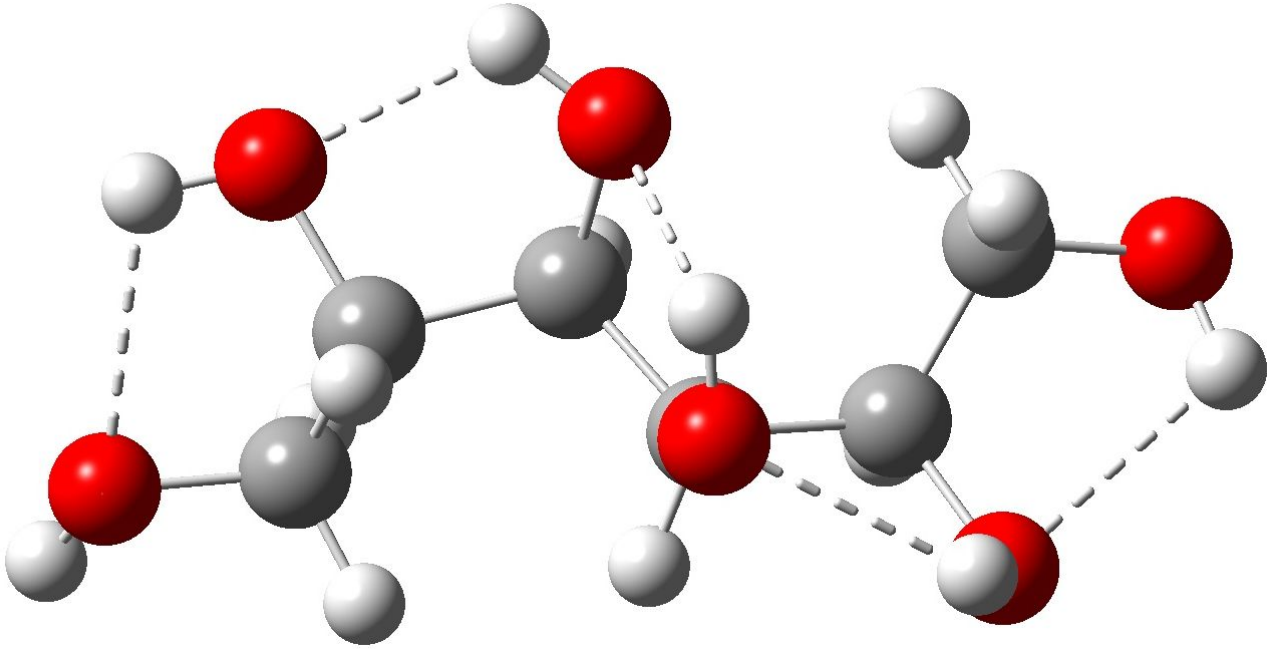


Этиленгликоль

Молекулярные модели просветляющих агентов

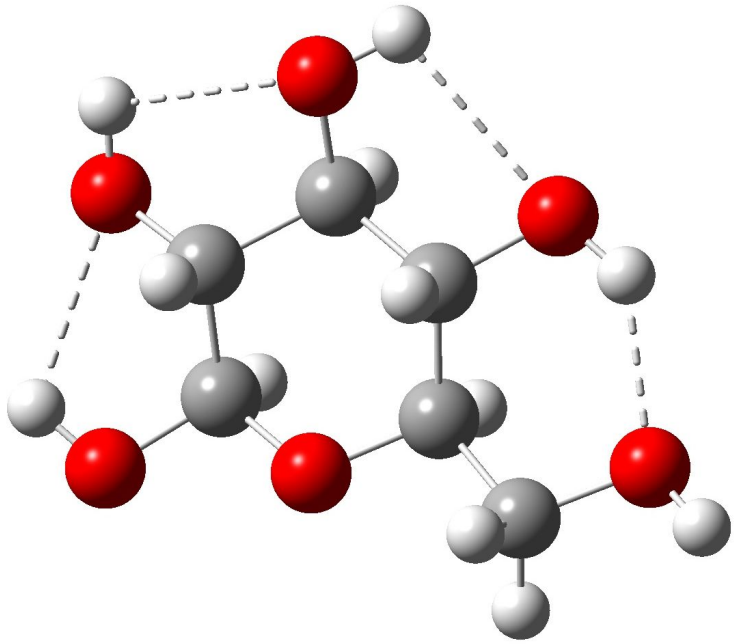


Глицерин

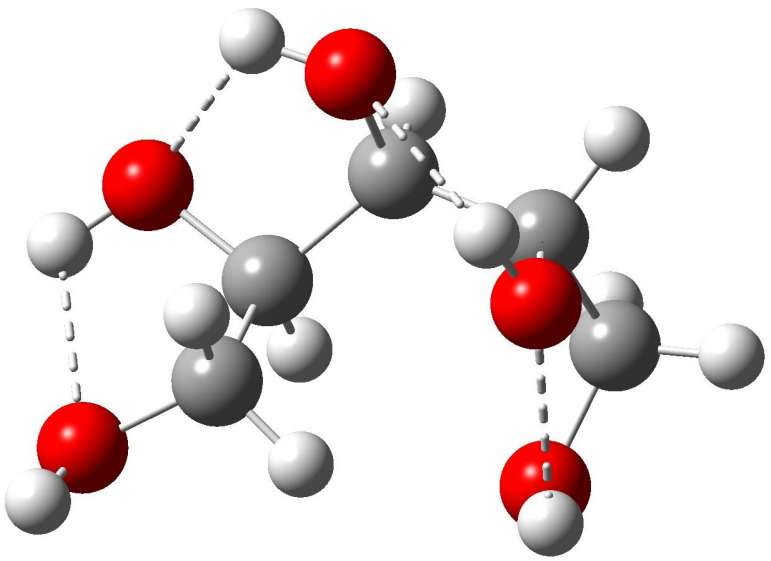


Сорбитол

Молекулярные модели просветляющих агентов

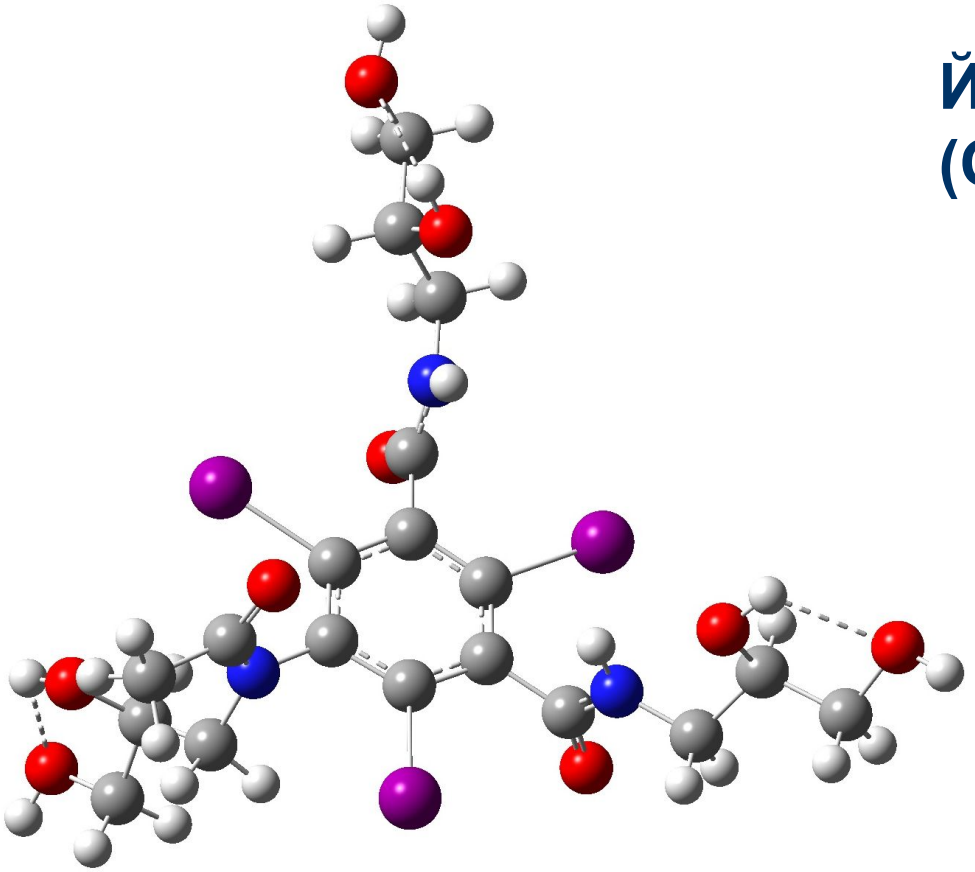


Глюкоза



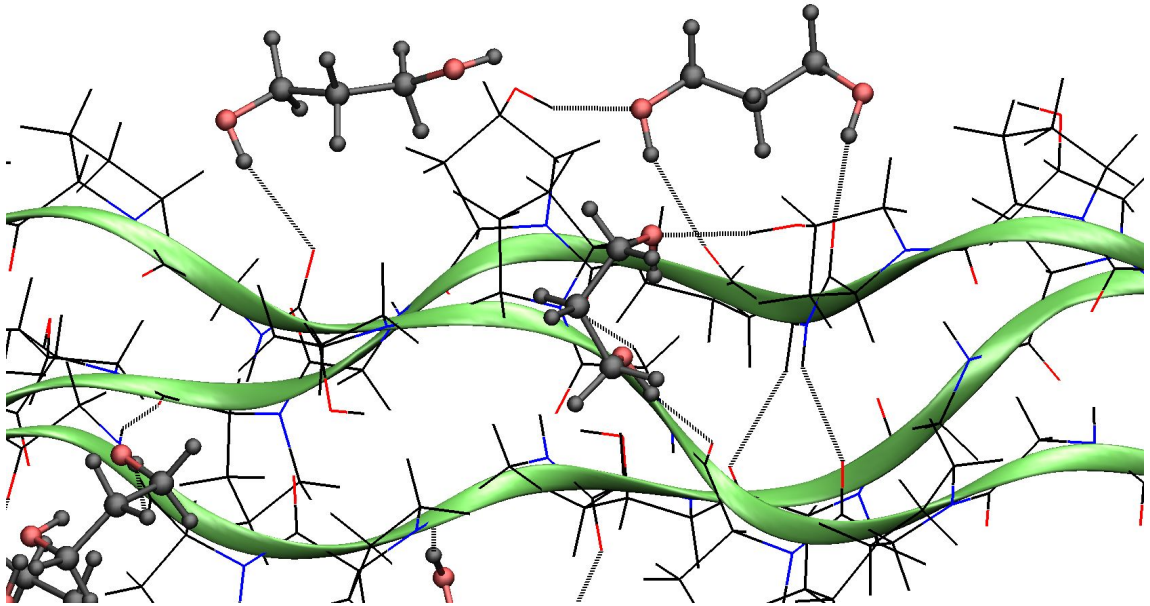
Ксилитол

Молекулярные модели просветляющих агентов

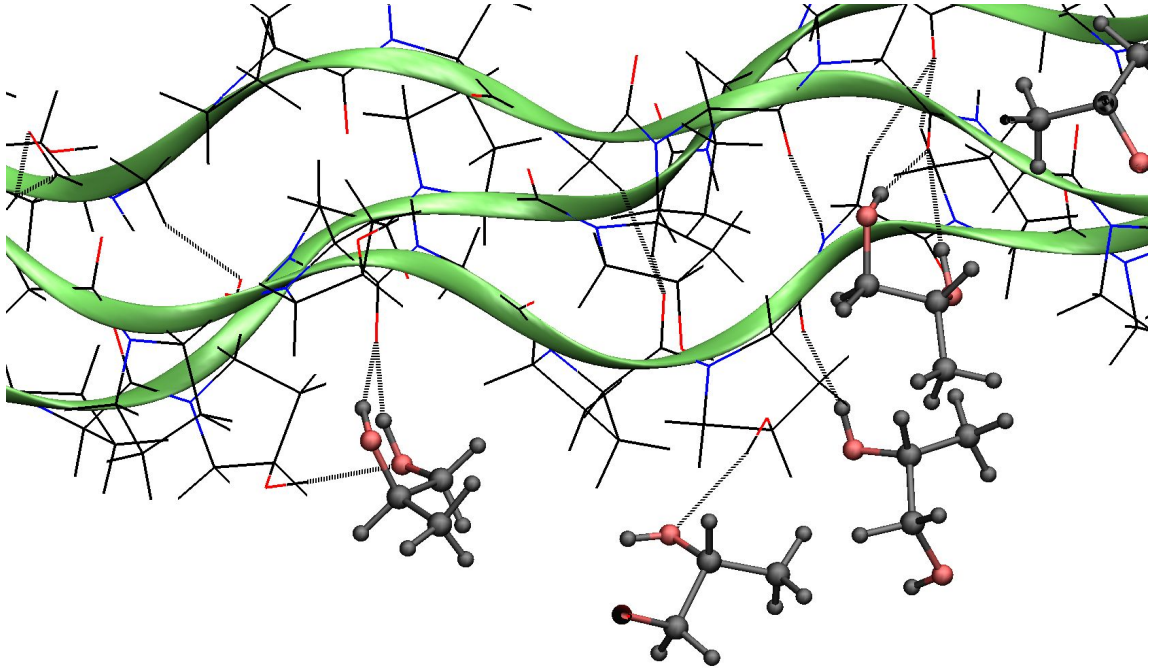


Йогексол (Омнипак)

Межмолекулярное взаимодействие



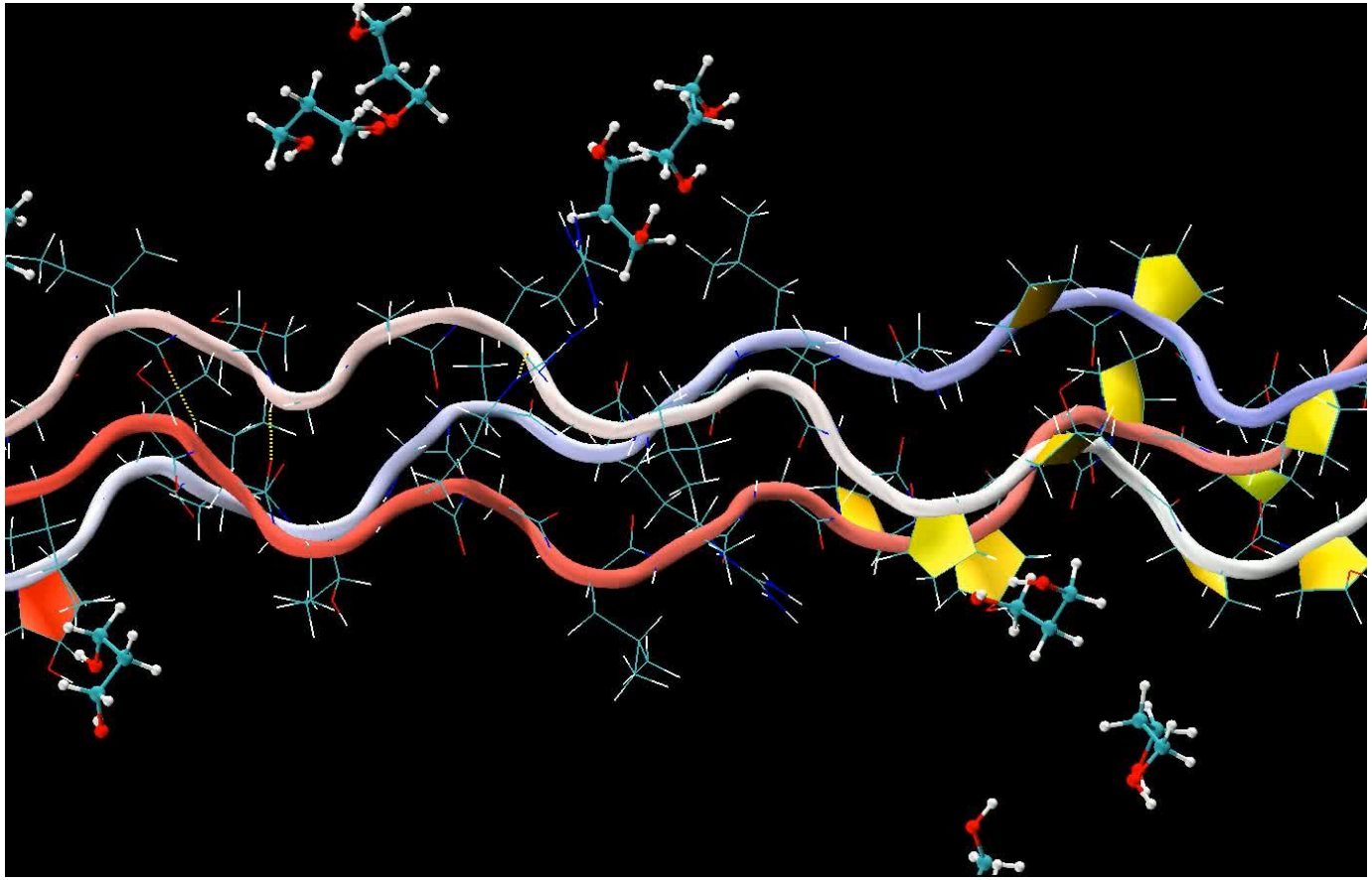
Пептид ((GPH)$_3$)$_{10}$+1,3 пропандиол



Пептид ((GPH)3)10+1,2 пропандиол

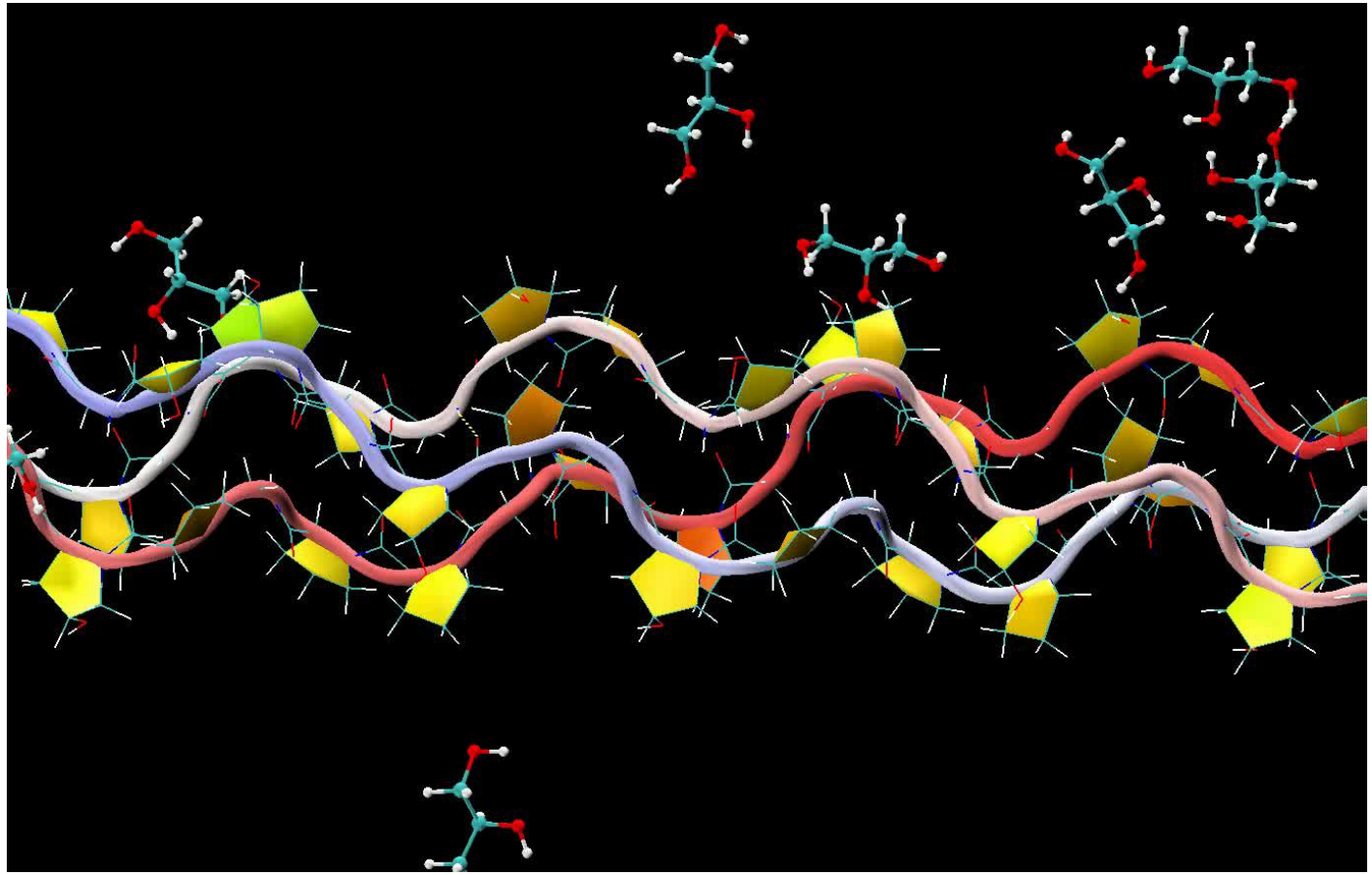
Межмолекулярное взаимодействие

Пептид 1BKV+1,3 пропандиол



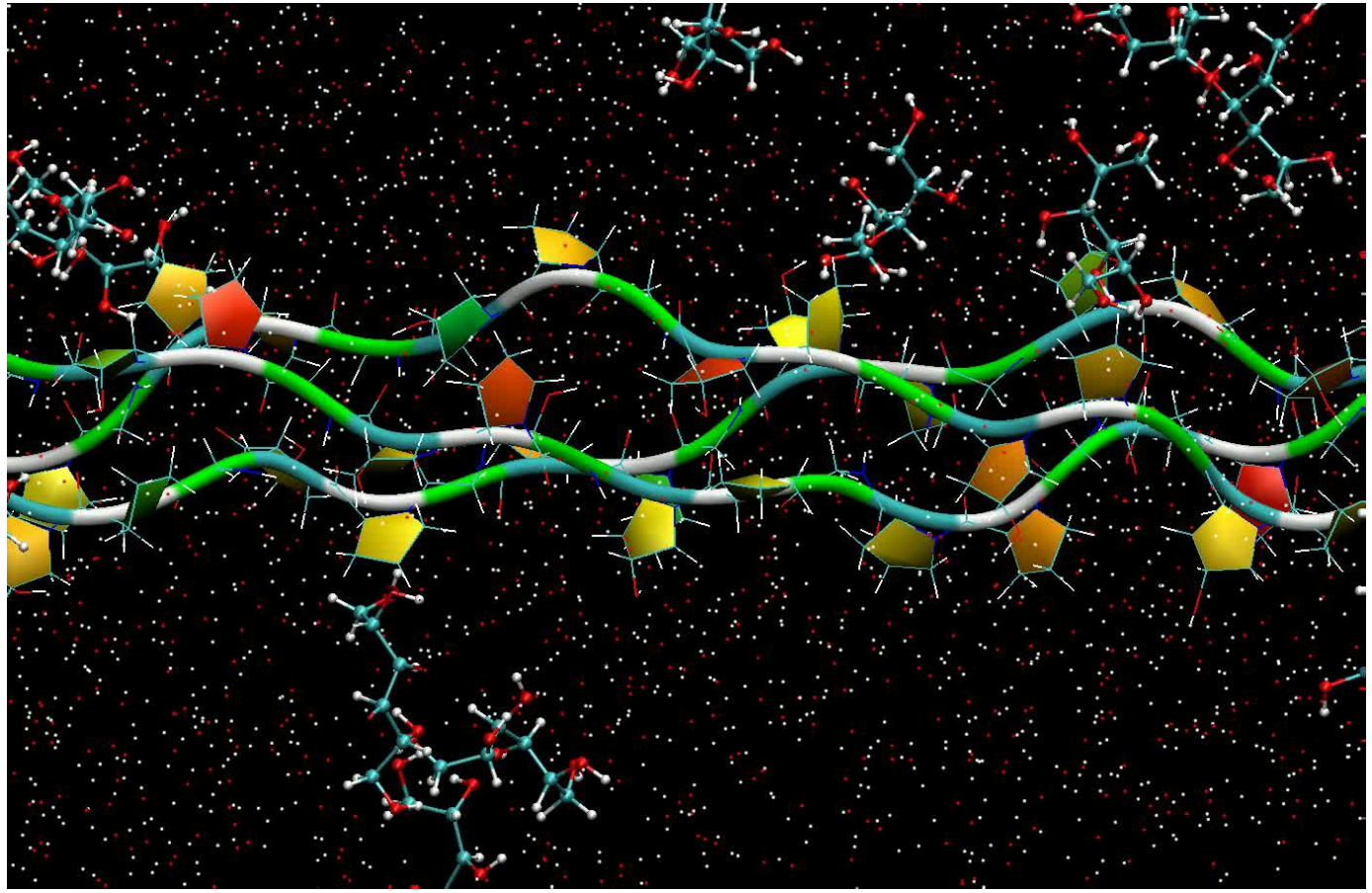
Межмолекулярное взаимодействие

Пептид
$((GPH)_3)_{10}$+глицерин



Межмолекулярное взаимодействие

Пептид
$((GPH)_3)_{10}$+сорбитол+вода

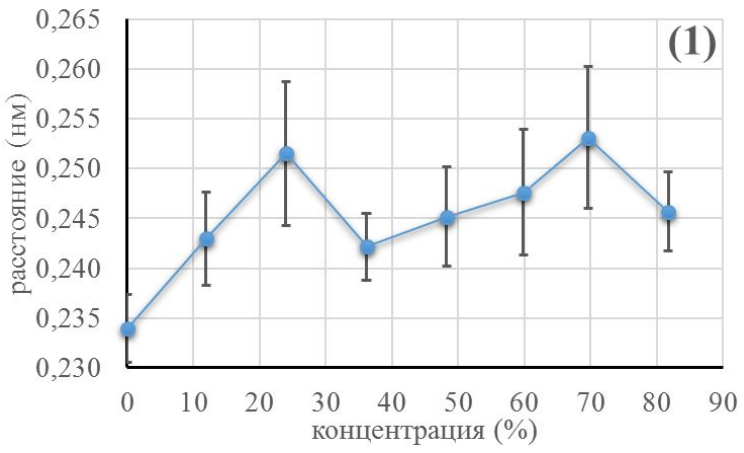


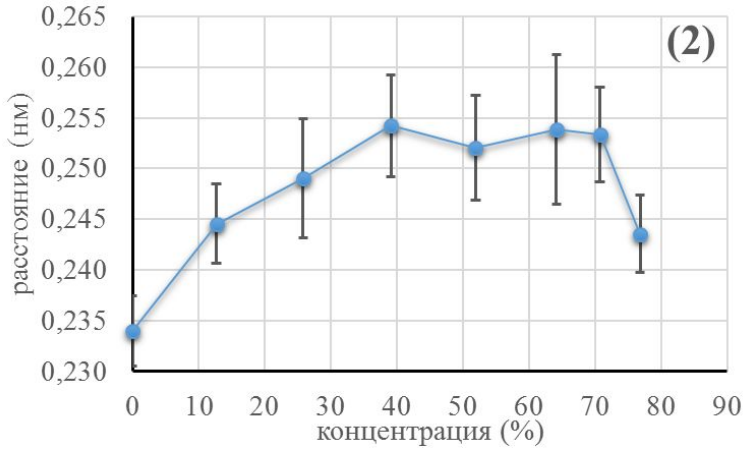
Результаты молекулярного моделирования

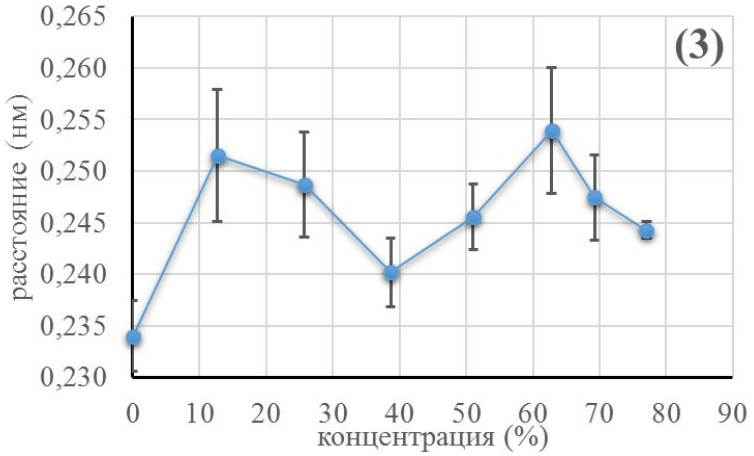
Аминокислотный остаток		Занятость (%)		
Название (сокращение)	Кол-во в коллагене	1,2-этандиол	1,2-пропандиол	1,3-пропандиол
Глицин (GLY)	27	17.5	14.8	15.5
Гидроксипролин (HYP)	27	47.0	52.3	53.4
Пролин (PRO)	27	1.8	1.2	1.4
	Всего:	**66.4**	**68.3**	**70.3**

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







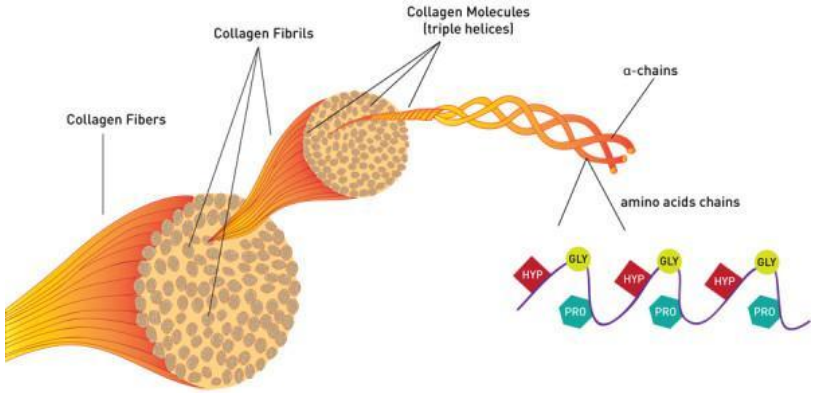
На графиках представлены зависимости среднего расстояния (в нм) между остовными группами различных α-цепей коллагена от массовой доли (в %) молекул 1,2-этандиола – (1), 1,2-пропандиола – (2) и 1,3-пропандиола – (3). Вертикальными черточками обозначен уровень стандартной ошибки полученных арифметических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

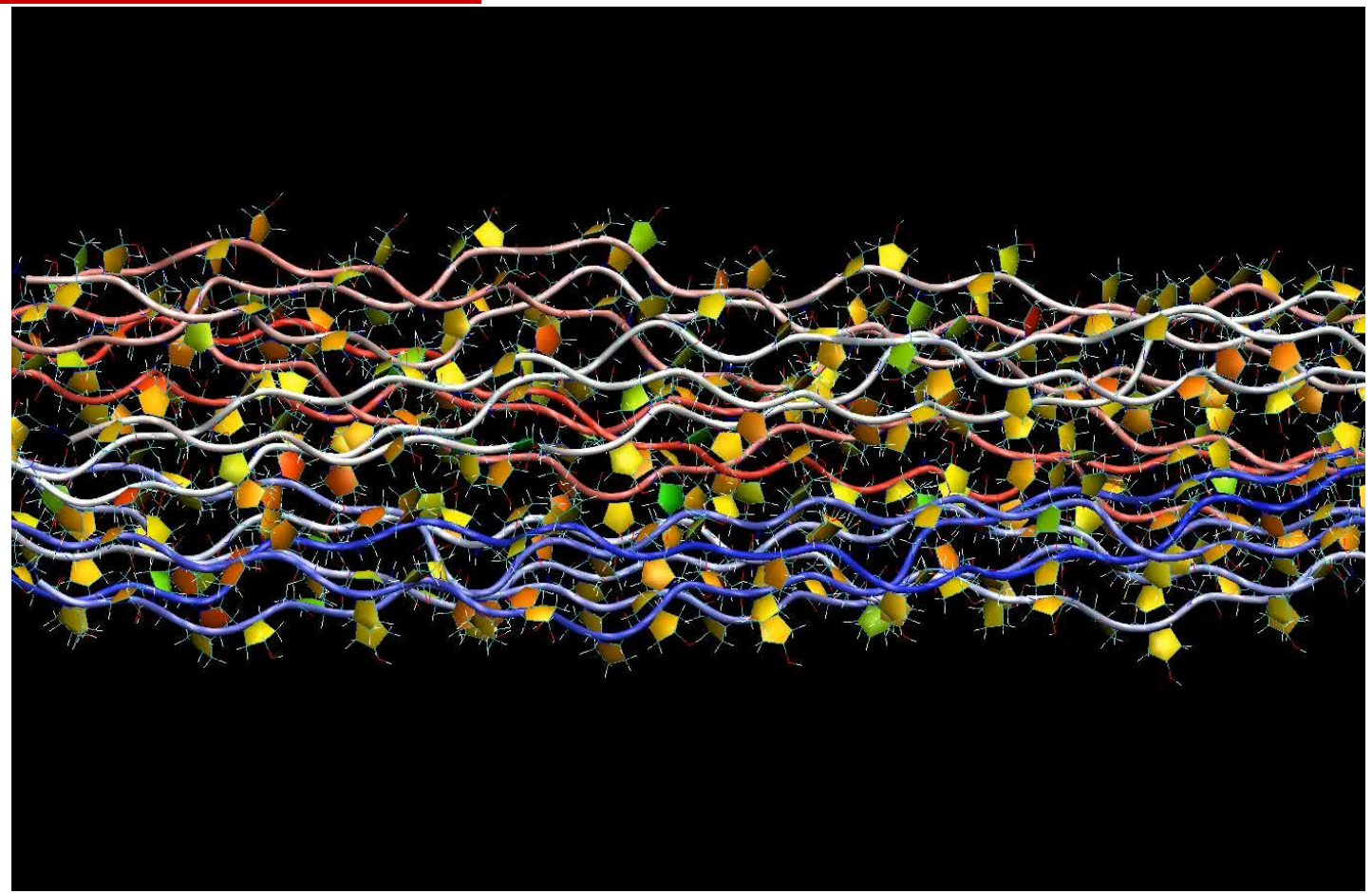
Выводы

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 (внутритканевую 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 Рэлея-Ганса-Дебая).

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

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

где μ_s – коэффициент рассеяния,

σ_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 ϕ – объемная доля рассеивателей, и a – радиус рассеивающей частицы.