

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра Оптики и биофотоники

**Исследование оптического просветления кожи *in vivo* растворами
глицерина и Омнипака**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 434 группы
направления 03.03.02 ФИЗИКА
физического факультета

Прокопенко Ивана Алексеевича

Научный руководитель (руководитель)

Ассистент кафедры оптики и биофотоники _____ П.А.Тимошина

Зав. кафедрой, профессор, д.ф.-м.н. _____ В.В.Тучин

Саратов, 2016

Введение

Оптические методы являются перспективными для диагностики и лечения различных заболеваний, преимуществами которых являются: безопасность для пациентов, простота в использовании, а также низкая себестоимость. Но главной проблемой современной лазерной медицины остается транспорт зондирующего излучения через поверхностные слои биоткани. А также, при диагностике подкожных и внутрикожных заболеваний оптическими методами наблюдается, что значительное рассеяние излучения в видимом и ИК спектре ограничивает пространственное разрешение и глубину зондирования [1-3]. Одним из решений данной проблемы является снижение светорассеяния путем иммерсионного просветления биотканей.

Известно, что главной причиной рассеяния оптического излучения в биоткани является различие показателей преломления между структурными компонентами ткани (коллагеновыми и эластиновыми волокнами) и внутритканевой средой, а также между клеточными органеллами и цитоплазмой клеток [1-3]. Оптическое просветление основано на взаимодействии ткани и биосовместимого иммерсионного вещества, именуемого оптическим просветляющим агентом (ОПА), который обычно имеет высокую осмолярность и более высокий показатель преломления, чем внутритканевая жидкость [4]. Для объяснения снижения светорассеяния биотканей за счет влияния просветляющего агента предложено несколько механизмов [5]: осмотическая дегидратация биоткани, частичная замена внутритканевой жидкости на ОПА, при которой происходит согласование показателей преломления структурных компонентов биоткани, структурная модификация или диссоциация коллагена биоткани.

Первый механизм заключается в выводе воды из внутритканевого или межклеточного пространства. Концентрация растворимых компонентов, повышается, увеличивается показатель преломления, а также усиливается

плотность упаковки и упорядоченность рассеивателей (клеточных структур, коллагеновых и эластиновых волокон), что способствует оптическому просветлению биоткани.

Второй механизм наблюдается в основном для фиброзных тканей, к числу которых относится дерма кожи, так как размеры молекул просветляющего агента намного меньше среднего диаметра поперечного сечения межфибриллярных промежутков [4,5]. В обоих случаях вызывает согласование показателей преломления основных рассеивающих объектов и цитоплазмы (для клеточных структур) или внутритканевой жидкости (для фиброзных тканей).

К изменению рассеяния биоткани приводит структурная модификация коллагена. Известно, что коллаген обладает растворимостью в сахарах (глюкоза, фруктоза и др.) и сахарных спиртах (этиленгликоль, глицерин, сорбитол и др.) [6]. Просветляющие агенты вызывают набухание биотканей и диссоциацию коллагеновых фибрилл на микрофибриллы [6]. Эта дестабилизация структуры коллагена может приводить к дополнительному снижению рассеяния света биотканью за счет уменьшения размеров рассеивателей [6].

Следует так же отметить, что в реальности первые два механизма могут проявляться одновременно, различаясь лишь степенью вклада в просветляющий эффект в зависимости от просветляющего агента. Третий механизм оказывает влияние на степень просветления, по-видимому, только при длительном воздействии гиперосмотических иммерсионных жидкостей на биоткань. Методика ОП очень популярна в последнее десятилетие, потому что очень проста в использовании, имеет низкую себестоимость и безопасна для пациентов. Существуют различные ОПА для оптического просветления биотканей и крови, такие как глицерин, Омнипак (йогексол 755 мг/мл), глюкоза, маннитол, сорбитол, этиленгликоль, глюкоза, декстроза, фруктоза, пропиленгликоль, полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль, 1,3-бутендиол и их комбинации.

Из них глицерин является одним из наиболее широко используемых просветляющих агентов для оптического просветления кожи. Многочисленные эксперименты *in vivo* показали, что возникают дополнительные факторы, такие как метаболическая реакция живой биоткани на гиперосмотический иммерсионный агент, особенности функционирования биоткани и влияние физиологической температуры на скорость процесса, которые необходимо учитывать, поскольку они могут значительно изменять как скорость, так и величину просветляющего эффекта. При использовании в качестве просветляющего агента растворов глицерина высокой концентраций могут иметь место побочные эффекты, такие как нарушение структуры биоткани и стаз мелких кровеносных сосудов.

Также в качестве ОПА используются рентгеноконтрастные агенты, такие как оксилан, йомерон, гексабрикс, визипак, верографин, омнипак и другие.

Цель

Целью данной дипломной работы стало исследование влияния 60 % водного раствора глицерина и рентгеноконтрастного раствора Омнипак (йогексол 755 мг/мл) на оптические свойства кожи *in vivo* измерений. Для осуществления данной задачи были проведены *in vivo* исследования влияния растворов глицерина и Омнипака (йогексол 755 мг/мл) на добровольцах, используя оценку изменения коэффициента ослабления света проходящего через кожу, путем анализа сканов полученных с помощью Оптической когерентной томографии.

Структура дипломной работы:

Дипломная работа включает в себя краткий обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и список литературы. Работа представлена на 50 страницах. Содержит 19 рисунков, 1 таблицу и 70 источников.

Основное содержание работы

Поскольку оптические технологии имеют быстрое и продуктивное развитие, оптические методы диагностики, мониторинга и лечения широко вошли в употребление в медицине и косметологии. Оптические методы обеспечивают безопасный и неинвазивный мониторинг биологических тканей и жидкостей, эффективную и целенаправленную хирургию, является информативным диагностическим аппаратом. Тем не менее, дальнейшее развитие оптических технологий часто ограничено высоким рассеянием света в биологических тканях. Сильное рассеяние света обусловлено неоднородной структурой ткани, которая включает в себя компоненты с различными показателями преломления: клеточные органеллы, волокна, интерстициальная жидкость.

Оптическое просветление ткани помогает решить проблему высокой степени рассеяния света в ткани, что ограничивает применение оптических методов в биомедицинской оптике из-за низкой глубины проникновения света. Техника оптического просветления эффективно используется в офтальмологий, дерматологий, а также в томографии мозга.

Оптическое просветление биотканей основано на согласовании показателей преломления рассеивателей (коллагеновых и эластовых волокон, клеток и клеточных отсеков) и мелких частиц (межклеточной жидкости и/или цитоплазмы) ткани и крови под воздействием экзогенного оптического просветляющего агента. Технология оптического просветления позволяет эффективно контролировать оптические свойства тканей и крови. Такой контроль приводит к существенному уменьшению рассеивания, и, следовательно, вызывает гораздо более высокий коэффициент пропускания (оптическое просветление), появление большого количества слабо рассеянных фотонов («змеиные фотоны») и баллистических фотонов, позволяющих успешно применять различные методы диагностики и терапии,

и точной лазерной хирургий. Неинвазивное зондирование глюкозы и контроль доставки лекарственного средства также очень перспективны.

Основные механизмы оптического просветления заключаются:

В общем коэффициент рассеяния (μ_s) и коэффициент анизотропий рассеяния (g) ткани зависят от различия показателя преломления между компонентами клеточной ткани: клеточной мембраны; цитоплазмы; ядра клетки; клеточной органеллы; гранулы меланина; и внеклеточной жидкости.

Для получения волокнистой (соединительной) ткани (глазной склеры и роговицы, дермы кожи, церебральной мембраны, мышцы, волокнистых компонентов женской груди, хрящей, сухожилий и т.д.), показатель несогласованности внутритканевой среды и длинных нитей фибриллярных белков (коллаген, эластин, или ретикулин) имеет важное значение.

Ядра и цитоплазматические органеллы в клетках млекопитающих, содержащие схожие концентрации белков и нуклеиновых кислот, имеют показатели преломления (1.38-1.41), которые попадают в узкий диапазон при длине волны 589 нм. Измеренный показатель преломления для ядра равен 1.39 [6]. Показатель преломления для мелких частиц обычно принимается в диапазоне от 1.35 до 1.37 [6]. Рассеяние самих частиц (органелл, белковых фибрилл, мембраны и белковые глобулы) имеет более высокую плотность белков и липидов по сравнению с основным веществом и, таким образом, имеет больший показатель преломления (1.39-1.47).

Показатель преломления из соединительной ткани составляет приблизительно 1.41 и зависит от гидратаций коллагена, его основного компонента. Показатель преломления внутритканевой жидкости, а также плазма крови человека, составляет приблизительно 1.33-1.35, в зависимости от длины волны. Основным рассеивателем в крови являются красные кровяные тельца (эритроциты). Эритроциты представляют собой клетки без ядер; они содержат в себе около 70% воды, 25% гемоглобина, а также 5% липидов, сахаров, солей, ферментов и белков [6]. Показатель преломления

сухих эритроцитов при длине волны 550 нм, находится в диапазоне 1.61-1.66 [6].

Концентрация гемоглобина от 32 г/дл представляет собой типичную концентрацию гемоглобина в эритроцитах человека, а показатель преломления составляет 1.42. Для человеческой крови, в зависимости от длины волны, показатель преломления составляет приблизительно 1.36-1.4 [6].

Есть несколько основных механизмов ослабления светорассеяния индуцированного просветляющими агентами: выборочное обезвоживание тканей; частичная замена межклеточной жидкости на иммерсионный раствор; и структурная модификация или диссоциация коллагена.

Первый механизм характерен только для высоко гиперосмотических агентов. Для волокнистой ткани подобной склеры, твердой мозговой оболочки, дермы и так далее, второй механизм преобладает для всех испытанных химических агентов, так как их размер молекулы значительно меньше среднего поперечного сечения межволоконного пространства [6]. Оба процесса в основном вызывают согласование показателей преломления рассеивающих тканей (осеки клеток, волокна коллагена и эластина) и цитоплазмы и/или межклеточной жидкости.

Соответственно показатель преломления проявляется в уменьшении коэффициента рассеяния ($\mu_s=0$) и увеличений одного прямого рассеяния ($g=1$). Для волокнистых тканей, таких как дермы кожи, склеры глаза, твердой мозговой оболочки, сухожилия, и так далее, снижение μ_s может быть очень высоким [6].

Структурная модификация может привести к сжатию ткани- то есть вблизи порядка пространственной корреляций рассеивателей и, как следствие, повышений конструктивной интерференций элементарно рассеивающих областей в прямом направлении и деструктивной интерференций в перпендикулярном направлении падающего света, что может значительно увеличить коэффициент пропускания ткани даже при

некотором преломляющем показателе рассогласованности. Для некоторых тканей и неоптимизированных рН просветляющих агентов может наблюдаться набухание тканей, которые будут рассматриваться как конкурентный процесс в обеспечении оптического просветления тканей.

Оптическое просветление тканей коллагена может повлечь за собой изменение в надмолекулярной структуре. Коллаген обратим растворим в сахарах и сахарных спиртах. Агент, индуцированный дестабилизацией коллагеновых структур, может привести к дополнительному снижению оптического рассеяния в ткани, вследствие меньшего размера основных рассеивателей.

Для использования гиперосмотических агентов, осмотическое давление может играть существенную роль. С одной стороны, осмотическое давление вызывает генерацию потоков жидкой среды и средства контроля интенсивности этих потоков; тем не менее, с другой стороны, достаточно сильное осмотическое давление может разрушить структуру ткани. Это является одним из основных физико-химических механизмов токсичности просветляющих агентов.

Для распространения поляризованного света было показано, что при уменьшении рассеяния свет улучшает степень линейной поляризации. Что касается просветленной ткани, число событий рассеяния уменьшается и остаточная степень поляризации, передаваемая линейно-поляризованным светом, возрастает. В результате, кинетика среднего коэффициента и степени поляризации ткани коррелируют. Просветляющие агенты приводят к увеличению длины поляризации ряда тканей.

Материалы и методы

Исследования просветления кожи человека *in vivo* под действием 60% водного раствора глицерина и раствора Омнипака (300 мг/мл) проводились с помощью оптического когерентного томографа Spectral Radar OCT System OSP930SR 022 (Thorlabs Inc., США) на длине волны 930 нм представленного на рис 14. Ширина спектральной полосы составляла 100 нм, выходная

мощность – 2 мВт, оптическая глубина сканирования – 1.6 мм, разрешение системы по глубине было равно 6.2 мкм.

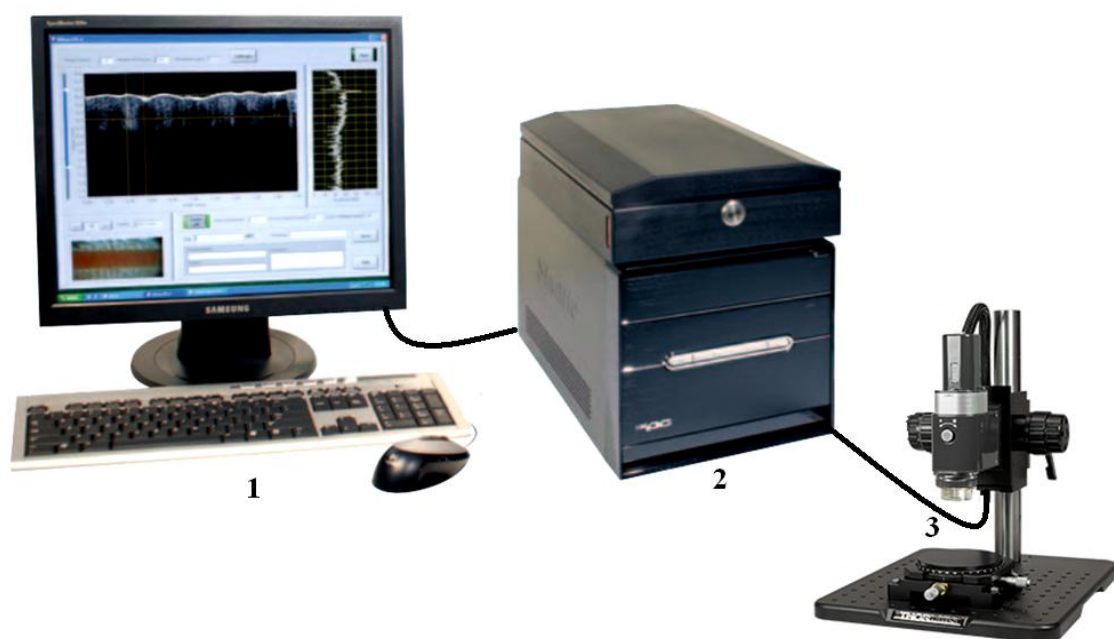


Рис 14. Экспериментальная установка: 1 – ПК; 2 - Spectral Radar OCT System OCP930SR 022; 3 – Регистратор сигнала

В качестве иммерсионных агентов использовался 60% водный раствор глицерина, показатель преломления которого 1,415 а также Омнипак (300 мг/мл), показатель преломления которого равен 1,438. Показатели преломления раствора измерялись на длине волны 589 нм на рефрактометре Аббе ИРФ-454Б2М (Россия).

Измерения проводились на участке кожи с внутренней стороны предплечья. Размеры образцов биоткани составляли порядка 20 x 20 мм. Запись сканов с исследуемой области проводилась до воздействия иммерсионных агентов, затем каждый 5 минут во время действия агентов, процедура записи повторялась в течение 50 минут. В измерениях участвовало 10 добровольцев, возраст которых составлял 19-23 года, было проведено 20 экспериментов.

2.4 Методика обработки полученных данных

Полный коэффициент ослабления света на участке биоткани μ_t , представляющий собой сумму коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , может быть получен методом подбора параметров аппроксимирующей кривой, рассчитанной с помощью соответствующей модели, на интересующем участке в области наклона А-скана ОКТ-сигнала.

Модель однократного рассеяния основана на предположении, что только свет, испытавший однократное рассеяние, сохраняет когерентные свойства и вносит свой вклад в формирование ОКТ-сигнала. Модель однократного рассеяния справедлива как для слабо рассеивающих биотканей, так и в области поверхностных слоев биоткани, где режим однократного рассеяния назад является преобладающим. ОКТ-сигнал в данном случае определяется как

$$\langle\langle i^2(z) \rangle\rangle^{1/2} \approx \langle\langle i^2_0 \rangle\rangle^{1/2} (\exp(-2\mu_t z))^{1/2} \quad (10)$$

где $i(z)$ – ОКТ-сигнал, z – расстояние от поверхности ткани до участка, от которого пришел отраженный сигнал.

Известно, что результатом ОКТ-исследования является измерение зависимости интенсивности ОКТ-сигнала исследуемой ткани, $R(z) \approx \langle\langle i^2(z) \rangle\rangle^{1/2}$, от глубины z . Интенсивность ОКТ-сигнала зависит от отражательной способности $\alpha(z)$ биоткани на заданной глубине, определяемой локальным показателем преломления и локальной способностью биоткани рассеивать свет, и полного коэффициента ослабления $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ биоткани. В соответствии с моделью однократного рассеяния отраженная мощность пропорциональна $\exp(-\mu_t z)$, т.е. может быть аппроксимирована выражением

$$R(z) = A \exp(-\mu_t z) + B \quad (11)$$

где A – коэффициент пропорциональности, равный $P_0\alpha(z)$, P_0 – оптическая мощность в пучке, падающем на поверхность биоткани, B – фоновый сигнал.

Оценка коэффициентов ослабления света в биоткани просветляющих агентов была выполнена с помощью специально разработанной компьютерной программы на основе анализа кинетики изменения рассеивающих характеристик кожи человека (рис.15).

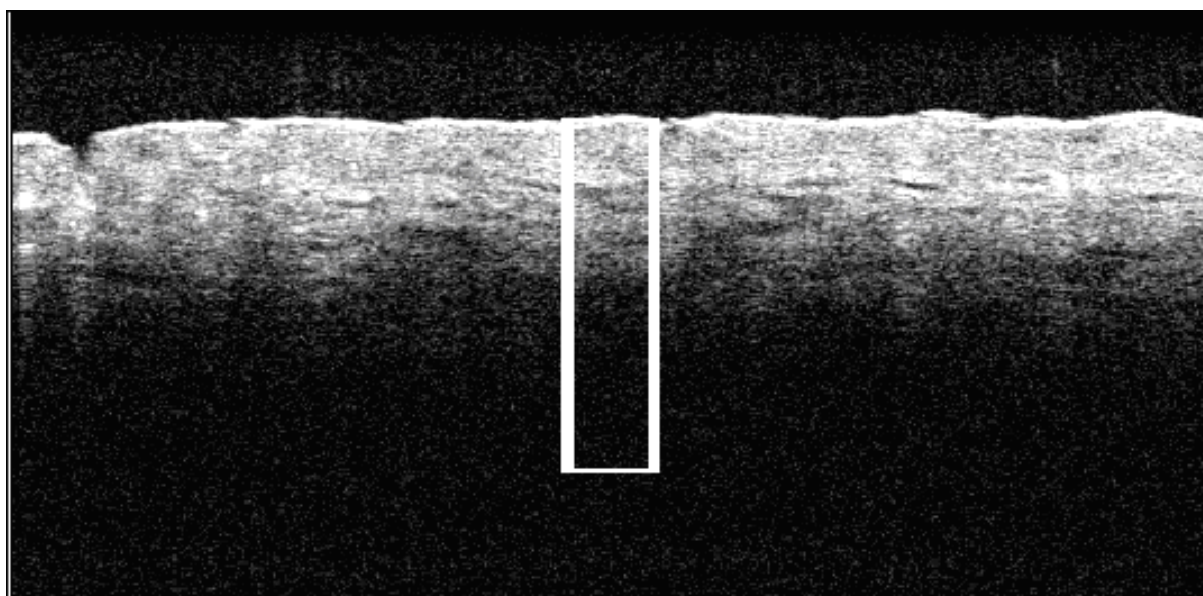


Рис.15 ОКТ скан исследуемой области с выделенным окном для расчета коэффициента ослабления

Далее рассчитанные коэффициенты ослабления усреднялись по трем областям анализа, с подсчетом стандартного отклонения.

3. Результаты и обсуждение

На рис. 16 и рис. 17 представлены типичные ОКТ - изображения исследуемых участков кожи до воздействия просветляющих агентов, после 5 и 50 минут после нанесения просветляющего агента и соответствующие зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи.

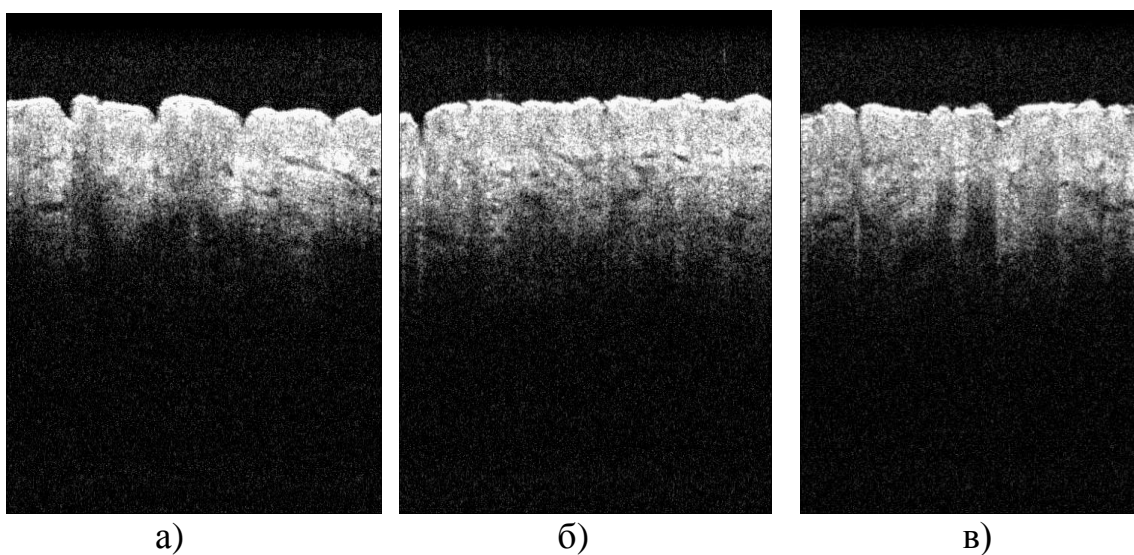


Рис. 16 Типичное изображение ОКТ для 60% глицерина: а) без воздействия, б) 5 минут воздействия, в) 50 минут после нанесения агента

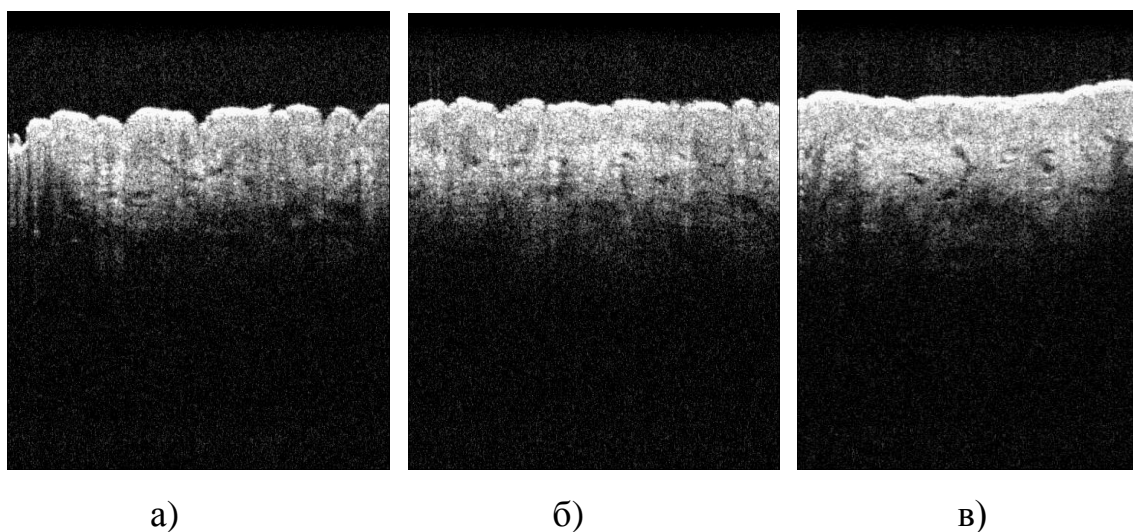


Рис.17 Типичное изображение ОКТ для Омнипака (300 мг/мл): а) без воздействия, б) 5 минут воздействия, в) 50 минут после нанесения агента

На рисунке 18, представлен график изменения коэффициента ослабления при использовании глицерина.

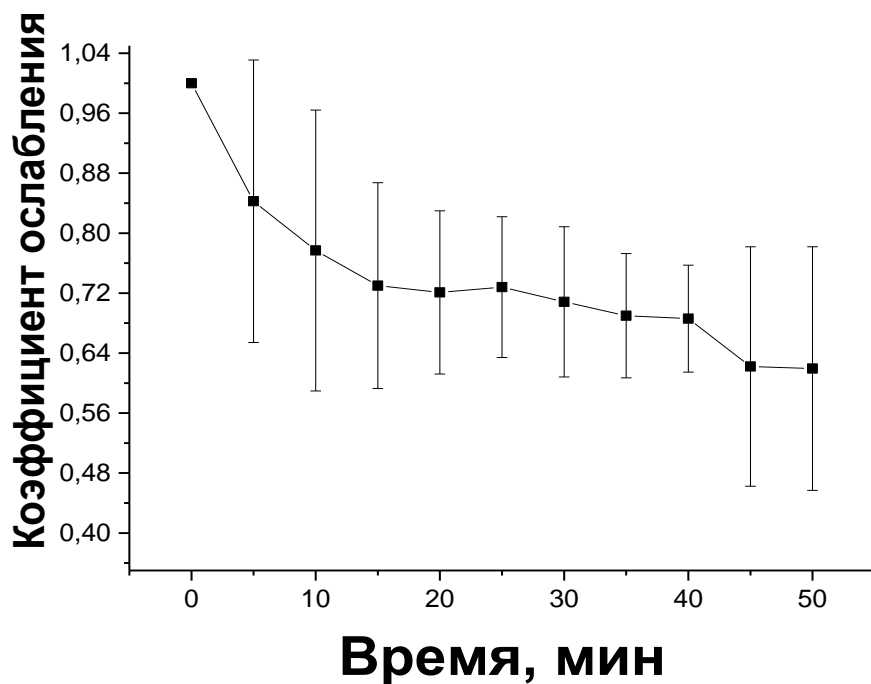


Рис. 18. График зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи при использовании 60% раствора глицерина.

На рисунке 19, представлен график изменения коэффициента ослабления при использовании Омнипака (300 мг/мл).

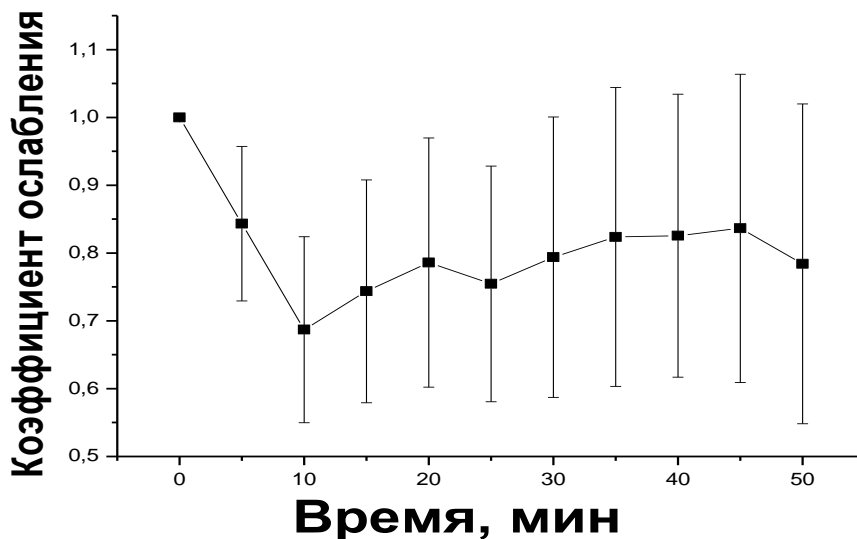


Рис. 19. График зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи при использовании Омнипака (300 мг/мл).

Применение оптических просветляющих агентов приводит к увеличению глубины оптического зондирования кожи. На приведенных графиках коэффициент ослабления света снижается при нанесении каждого из использованных оптических просветляющих агентов, что подтверждает снижение рассеяния света в коже.

Просветляющий агент	Эффективность просветления
60% раствор глицерина	38%
Омнипак (300 мг/мл)	22%

Табл. 1 Эффективность просветления

Заключение

В ходе работы была изучена методика оптического просветления и проанализированы различные статьи по данной теме. В данной работе была продемонстрирована эффективность применения водного 60% раствора глицерина и раствора Омнипака (300 мг/мл) в качестве просветляющих агентов в исследованиях *in vivo*. При этом применение водного 60% раствора глицерина показывает большую эффективность просветления, которая составила 38%, относительно раствора Омнипака (300 мг/мл) с эффективностью просветления 22%. Применение оптических просветляющих агентов приводит к увеличению глубины оптического зондирования кожи, таким образом, улучшая визуализацию биологических тканей. Одним из возможных применений данных растворов могут быть исследования микроциркуляции мозгового кровотока у малых животных с использованием технологии оптического просветления или новорожденных, визуализация капилляров ногтевого валика человека через кожу или поверхностных слоев внутренних органов.

Список литературы:

1. Тучин, В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике / В.В. Тучин. М. : ФИЗМАТЛИТ, 812 с. (2012)
2. Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, Ю. П. Синичкин, В. В. Тучин Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследование *ex vivo* и *in vivo*. Оптика и спектроскопия, том 109, № 2, с. 256–263 (2010)
3. Bashkatov A.N., Korolevich A.N., Tuchin V.V., Sinichkin Y.P., Genina E.A., Stolnitz M.M., Dubina N.S., Vecherinski S.I., Belsley M.S. // Asian J. Phys.. V. 15. № 1. P. 1–14.(2006)
4. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, A. A. Korobko, E. A. Zubkova, V. V. Tuchin, I. Yaroslavsky, and G. B. Altshuler, J. Biomed. Opt. 13(2), 021102-1–8 (2008)
5. D. Zhu, K.V. Larin, Q. Luo, and V.V. Tuchin, Recent progress in tissue optical clearing, Laser Photonics Rev. **7(5)**, 732–757 (2013).
6. V.V. Tuchin, Optical Clearing of Tissues and Blood (SPIE Press, Bellingham, WA (2006)