

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

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

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПОДГОТОВЛЕННОЙ
НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ (ДИССЕРТАЦИИ)

аспиранта 4 курса

направления 03.06.01 «Физика и астрономия»

физического факультета

Швачкиной Марины Евгеньевны

Научный руководитель

доцент кафедры оптики и биофотоники,

к.х.н., доцент

_____ Правдин А.Б.

Саратов 2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В наше время одним из основных заболеваний, приводящих к нарушению зрения, является близорукость, серьезной формой которой является прогрессирующая миопия, характеризующаяся растяжением склеры. Перспективным методом лечения прогрессирующей миопии, не предполагающим внедрение инородных тел в организм, является коррекция механических свойств склеры задней поверхности глазного яблока посредством фотовоздействия, приводящего к образованию дополнительных ковалентных связей между молекулами коллагена внутри склеры (фотосшивание коллагена), с использованием рибофлавина в качестве сенсбилизатора и ультрафиолетового излучения. Ультрафиолетовое фотосшивание склерального коллагена повышает жесткость склеры и улучшает ее механические свойства, способствуя стабилизации патологического процесса (замедляя или даже останавливая патологические изменения) при прогрессирующей миопии, что доказано в экспериментах на мелких лабораторных животных [1-3]. В то же время, в литературе [4] отмечается недостаточная эффективность существующих методик кросслинкинга коллагена для склеры человека, что можно связывать с сильным рассеянием ультрафиолетового излучения биотканью, ослабляющим эффективность фотовоздействия в толще ткани. Увеличить глубину проникновения ультрафиолетового излучения в биоткань позволяет метод иммерсионного оптического просветления [5-8]. Нанесение иммерсионных агентов на склеру перед процедурой фотосшивания может увеличить эффективность данного метода и уменьшить дозу ультрафиолетового облучения (делая процедуру более безопасной). Эксперименты показывают [9], что сенсбилизированное фотовоздействие в условиях оптического иммерсионного просветления приводит к большему увеличению жесткости образцов склеры *ex vivo*, однако, механизм явления не был исследован. В литературе, в частности в [8], было отмечено уменьшение площади образца соединительной ткани (образованной сеткой пересекающихся коллагеновых пучков) при действии иммерсионных просветляющих агентов. В работе [10] показано, что модифицированные в результате оптического просветления оптические свойства дермы сохраняются после регидратации образца, если последний был подвергнут в просветленном состоянии химическому сшиванию коллагена. В свете этого ожидается, что иммерсионное воздействие просветляющих агентов на заднюю поверхность склеры приведет к сокращению поверхности склеры, то есть к купированию растяжения склеры при развитии миопии, а фиксация такого сжатого состояния путем образования

сшивок позволит не только замедлить развитие миопии, но и уменьшить уже развившиеся к моменту воздействия растяжение (изменение формы) задней стенки, и тем самым добиться не только стабилизирующего, но и терапевтического эффекта.

1. Wollensak, G. Collagen crosslinking of human and porcine sclera/ G. Wollensak, E. Spoerl //Journal of Cataract & Refractive Surgery – 2004 – V. 30 – №. 3 – P. 689-695.

2. Wollensak, G. Long-term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA)/ G. Wollensak, E. Iomdina //Acta ophthalmologica – 2009 – V. 87 – №. 2 – P. 193-198.

3. Wollensak, G. Cross-linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA/ G. Wollensak, E. Iomdina, D. D. Dittert, O. Salamatina, G. Stoltenburg //Acta Ophthalmologica Scandinavica – 2005 – V.83 – №.4 – P. 477-482.

4. Zhang, Y. Comparison of Riboflavin/Ultraviolet-A Cross-Linking in Porcine, Rabbit, and Human Sclera/ Y. Zhang, Z. Li, L. Liu, X. Han, X. Zhao, G. Mu // BioMed Research International – 2014 – V. 2014.

5. Генина, Э. А. Оптическое просветление склеры глаза in vivo под действием глюкозы/ Э. А. Генина, А. Н. Башкатов, Ю. П. Синичкин, В. В. Тучин //Квантовая электроника – 2006 – Т. 36. – №. 12. – С. 1119-1124.

6. Tuchin, V.V. Optical clearing of tissues and blood. – Bellingham: Spie Press – 2006.

7. Zhu, D. Recent progress in tissue optical clearing/ D. Zhu, K.V. Larin, Q. Luo, V.V. Tuchin //Laser & photonics reviews – 2013. – V.7 – N.5 – P. 732-757.

8. Тучина, Д. К. Оптическое просветление тканей кожи ex vivo под действием полиэтиленгликоля / Д. К. Тучина, В.Д. Генин, А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, В.В. Тучин //Оптика и спектроскопия – 2016 – Т.120 – №.1 – С. 36-45.

9. Швачкина, М. Е. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры / М. Е. Швачкина, А.Б. Правдин //Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика – 2015 – Т.15 – №.4. – С. 37-41

10. Tanaka, Y. Irreversible optical clearing of rabbit dermis for autogenic corneal stroma transplantation/ Y. Tanaka, D. Shi, A. Kubota, Y. Takano, N. Fuse, M. Yamato, T. Okano, K.Nishida //Biomaterials – 2011 – V.32 – №.28 – P. 6764-6772.

Целью данной работы является изучение влияния предварительного иммерсионного просветления на результаты процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания сильно рассеивающих коллагенсодержащих тканей.

Основными задачами данной работы являются:

1. Исследовать влияние иммерсионных агентов на коллимированное пропускание склеры на длине волны 370 нм (рекомендованная длина волны для рибофлавин/УФ фотосшивания).
2. Провести оценочные биомеханические измерения, направленные на изучения влияния предварительного иммерсионного просветления на эффективность рибофлавин/УФ фотосшивания
3. Оценить возможности использования поляризационно-микроскопического картографирования для картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах тканей, таких как склера, при использовании техники иммерсионного просветления.
4. Исследовать возможностей применения для контроля изменений биохимического состава, происходящих в ткани при фотосшивании, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции.
5. Разработать надежную методику оценки содержания воды в ткани для характеристики образцов коллагенсодержащей ткани на различных этапах процесса рибофлавин/УФ фотосшивания использования.
6. Разработать надежную методика, позволяющую оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации.
7. Исследовать влияние степени гидратации ткани во время фотовоздействия на свойства фотосшитой ткани после ее регидратации.

Объектом исследования являются сенсibilизированное рибофлавином фотосшивание в биологических тканях.

Предмет исследования: влияние воздействия осмотически активных просветляющих агентов на ткань на результат рибофлавин/УФ фотосшивания.

Методология и методы исследования.

В работе использовались статический метод измерения модуля Юнга при одноосном растяжении, метод трансмиссионного поляризационного микроскопического картографирования, метод нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции, метод визуализации времени жизни флуоресценции, использующий счет одиночных фотонов с корреляцией по времени, метод оптической когерентной томографии.

Достоверность полученных результатов обуславливается использованием апробированных методик измерений, адекватностью используемых теоретических моделей, воспроизводимостью результатов

экспериментов, а также согласием полученных результатов с данными, полученными другими исследователями.

Научная новизна работы:

1. Впервые экспериментально выявлена тенденция к большему увеличению жесткости образца склеры при рибофлавин/УФ фотосшивании в условиях предварительного иммерсионного просветления ткани.
2. Впервые продемонстрирована возможность использования метода поляризационного картографирования для структурной характеристики коллагенового матрикса в толстых (толщиной до 2 мм) образцах рыхлой соединительной ткани с применением техники иммерсионного просветления.
3. Разработана методика оценки локальной относительной концентрации рибофлавина в склере на различных этапах процесса рибофлавин/УФ фотосшивания, основанная на декомпозиции локальной функции затухания флуоресценции в условиях двухфотонного возбуждения по эмпирическим базисным функциям.
4. Установлено, что зависимость среднего показателя преломления коллагеновых пучков на длине волны 930 нм от объемного содержания воды в ткани может считаться линейной по меньшей мере в диапазоне значений объемного содержания воды от 0.8 до 0.2, и на этой основе разработана простая методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ).
5. Разработана ОКТ-методика, позволяющая оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации, а также распределение воды между коллагеновыми фибриллами и межфибриллярной жидкостью при дегидратации и регидратации ткани.
6. Впервые показано, что рибофлавин/УФ фотосшивание ткани в дегидратированном под действием иммерсионных агентов состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным, и оценено пороговое значение степени гидратации, при котором наблюдается фиксирование контрактированного состояния ткани.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

- Совокупность полученных результатов работы показывает, что рибофлавин/УФ фотосшивание коллагенсодержащих биологических тканей, подвергнутых перед облучением действию иммерсионных

агентов, может приводить к большему увеличению жесткости и контракции ткани, что позволяет рассматривать иммерсионное просветление как возможный этап предварительной обработки ткани в процедуре рибофлавин/УФ фотоукрепления склеры, способствующий улучшению эффективности этой процедуры.

- Найденные условия проведения измерений, позволяющие использовать результаты поляризационного картографирования для картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах ткани, могут быть использованы при разработке практических методик картирования макроструктуры коллагенового матрикса склеры, дермы, сухожилия, хряща, стенок кровеносных сосудов.
- Методика оценки локальной относительной концентрации рибофлавина, основанная на декомпозиции функций затухания флуоресценции, может быть положена в основу контроля диффузии рибофлавина в склеру при его поверхностном нанесении *in vivo*.
- Разработанные ОКТ-методики контроля содержания воды и иммерсионного агента в образцах ткани могут быть эффективно использованы при исследовании динамики воздействия различных иммерсионных агентов на коллагенсодержащие ткани.

На защиту выносятся следующие положения:

1. В условиях, когда рибофлавин/УФ фотосшивание осуществляется при уровнях объемной гидратации коллагеновых пучков меньше 0.8, может происходить фиксирование контрактированного состояния ткани за счет образования межфибриллярных сшивок.
2. Зависимость среднего показателя преломления коллагеновых пучков на длине волны 930 нм от объемного содержания воды в ткани может считаться линейной по меньшей мере в диапазоне значений объемного содержания воды от 0.8 до 0.2.
3. Разработанная методика определения содержания воды в ткани по величине среднего группового показателя преломления ткани.
4. Разработанная методика ОКТ-мониторинга изменения содержания воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках позволяет исследовать особенности воздействия иммерсионных агентов на пучки.

Научно-квалификационная работа состоит из введения, шести глав и заключения. В первой главе представлен обзор литературы по теме диссертации. Во второй главе представлены результаты экспериментальных исследований, направленных на определение влияния предварительного оптического просветления склеры перед процедурой рибофлавин/УФ

кросслинкинга на механическую прочность склеры. В третьей главе представлены результаты исследований, показывающие принципиальную возможность достаточно точного поляризационно-микроскопического картирования ориентации коллагеновых волокон в толстых (до 2 мм толщиной) образцах тканей, таких как склера, без секционирования, при применении техники иммерсионного просветления ткани. В четвертой главе представляются результаты исследования возможностей применения для контроля изменений, происходящих в ткани на разных стадиях процесса фотосшивания, нелинейной микроскопии в режимах регистрации сигнала генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции. В пятой главе представлена разработанная при выполнении данной работы методика оценки степени гидратации ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии. Также в этой главе представлена оригинальная методика, позволяющая оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении. С помощью этой методики исследованы особенности воздействия различных иммерсионных агентов на коллагеновые пучки. Кроме того, в этой главе представлены результаты исследования изменений характеристик двулучепреломления коллагеновых волокон при дегидратации и регидратации ткани, а также происходящих в результате взаимодействия ткани с иммерсионными агентами. В шестой главе представлены результаты исследований возможности фиксации контрактированного состояния ткани после рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженных уровнях гидратации ткани.

Полный объём работы составляет 219 страниц, включая 98 рисунков и 4 таблицы. Список литературы содержит 168 наименований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы по данной работе заключаются в следующем:

1. Исследовано влияние различных иммерсионных агентов, таких как 85%, 63.75% и 42.5% водные растворы глицерина, 40% и 54% водные растворы глюкозы, полиэтиленгликоль ПЭГ-300, на коллимированное пропускание склеры в ближней ультрафиолетовой области. Показано, что использование 85% раствора глицерина приводит к наибольшему увеличению коллимированного пропускания склеры на длине волны 370 нм.
2. Проведены оценочные биомеханические измерения, направленные на изучения влияния предварительного иммерсионного просветления на эффективность рибофлавин/УФ кросслинкинга склеры свиньи и кролика

- ex vivo*; отмечена тенденция к увеличению жесткости образца фотосшитого в условиях предварительного иммерсионного просветления.
3. Показана принципиальная возможность достаточно точного поляризационно-микроскопического картографирования ориентации коллагеновых волокон в толстых (до 2 мм толщиной) образцах тканей, таких как склера, без секционирования, при применении техники иммерсионного просветления ткани. Выявлены условия, при которых поляризационное картографирование способно обеспечить достаточно точные оценки параметров ориентации коллагеновых волокон в толстых образцах.
 4. Установлено, что для приповерхностных (с глубиной залегания до 70 мкм) областей образцов нативной свиной склеры в условиях двухфотонного возбуждения флуоресценции излучением с длиной волны 760 нм функции затухания флуоресценции могут сильно различаться в зависимости от локализации зондируемого участка, но средние нормированные функции затухания флуоресценции, полученные усреднением по нескольким участкам на одной глубине, приблизительно одинаковы для разных глубин образца и разных образцов, что свидетельствует об однородности склеральной ткани на глубине до 70 мкм.
 5. С использованием эмпирически найденных базисных функций, линейной суперпозицией которых можно аппроксимировать локальную функцию затухания флуоресценции соединительной ткани склеры, установлено, что каких-либо характерных изменений функции затухания флуоресценции, связанных с образованием рибофлавин/УФ фотосшивок в склере свиной *ex vivo*, при двухфотонном возбуждении флуоресценции излучением с длиной волны 760 нм не наблюдается.
 6. Разработана методика оценки локальной концентрации рибофлавина в сильно рассеивающей соединительной ткани при проведении процедуры рибофлавин/УФ фотосшивания, основанный на декомпозиции функций затухания флуоресценции по эмпирическим базисным функциям, соответствующим различным компонентам (коллагеновый матрикс, рибофлавин) системы.
 7. Разработана методика оценки содержания воды в ткани, основанная на измерении среднего группового показателя преломления ткани с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ). Показано, что эта методика может быть применена для мониторинга состояния таких коллагенсодержащих тканей, как сухожилие и склера, во время дегидратации и регидратации.

8. Разработана ОКТ-методика, позволяющая оценивать содержание воды и иммерсионного агента в коллагеновых пучках при их иммерсионном просветлении и последующей регидратации. С помощью этой методики исследованы особенности воздействия различных иммерсионных агентов (водных растворов глицерина, ПЭГ-300, пропиленгликоля и глюкозы, а также Омнипак) на коллагеновые пучки.
9. Проведены измерения характеристик двулучепреломления коллагеновых волокон в нативном состоянии, в условиях их частичной дегидратации и иммерсионного просветления. На основе результатов этих измерений проведена оценка изменения содержания воды в фибриллах и межфибриллярной жидкости при дегидратации и регидратации пучка.
10. Показано, что рибофлавин/УФ кросслинкинг ткани в дегидратированном под действием иммерсионных агентов состоянии может приводить к уменьшению объема ткани после ее регидратации по сравнению с нативным. Был установлен предельный уровень гидратации ткани при фотосшивании, при котором происходит фиксирование контрактированного состояния ткани после рибофлавин/УФ кросслинкинга, и оценена степень результирующей контракции ткани как функция степени гидратации ткани во время фотосшивания.

Апробация работы.

Основные результаты работы докладывались на **конференциях**:

- Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике (Saratov Fall Meeting' 2015) (Саратов, РФ, 2015);
- Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, РФ, 2015);
- Всероссийская молодежная научная школа-конференция «Практическая биофизика - 2015» (Саратов, РФ, 2015);
- Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике (Saratov Fall Meeting' 2016) (Саратов, РФ, 2016);
- VI Всероссийская неделя науки с международным участием, Week of Russian science (WeRuS-2017) (Саратов, РФ, 2017);
- Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике (Saratov Fall Meeting' 2017) (Саратов, РФ, 2017);
- XX международная конференция молодых ученых и специалистов "Оптика-2017" (Санкт-Петербург, РФ, 2017);

- XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, РФ, 2018);
- Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике (Saratov Fall Meeting' 2018) (Саратов, РФ, 2018).

Публикации автора по теме диссертации в российских и международных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК:

1. Швачкина, М. Е. Об использовании оптического просветления при укреплении склеры методом фотосшивания коллагена / М. Е. Швачкина, А. Б. Правдин // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2015. – Т. 15, №4. – С.37-41.
2. Yakovlev, D. D. Quantitative mapping of collagen fiber alignment in thick tissue samples using transmission polarized-light microscopy / D. D. Yakovlev, M. E. Shvachkina, M. M. Sherman, A. V. Spivak, A. B. Pravdin, D. A. Yakovlev // Journal of Biomedical Optics. – 2016. – Vol. 21. – №7. – P. 071111-1-071111-12
3. Швачкина, М. Е. Оценка возможностей трансмиссионного поляризационного картографирования для характеристики макроструктуры склеры / М.Е. Швачкина, А. Б. Правдин, Д. А. Тихонов, Т. Г. Каменских, Д. Д. Яковлев, Д. А. Яковлев // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. – Т.13,№2. – С. 435-441.
4. Bashkatov, A. N. Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing / A. N. Bashkatov, K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy, M. L. Chernavina, E. A. Genina, V. D. Genin, V. I. Kochubey, E. N. Lazareva, A. B. Pravdin, M. E. Shvachkina, P. A. Timoshina, D. K. Tuchina, D. D. Yakovlev, D. A. Yakovlev, I. Yu. Yanina, O. S. Zhernovaya, V. V. Tuchin // Journal of Biomedical Optics. – 2018. – Vol.23. – №9. – P.091416.
5. Shvachkina, M. E. Influence of optical clearing on collagen crosslinking of sclera / M. E. Shvachkina, A. I. Knyazkova, E. A. Sandykova //Journal of Physics: Conference Series. 2019. – Vol. 1145. – №1. – P. 012056.
6. Швачкина, М. Е. Мониторинг процесса иммерсионного оптического просветления коллагеновых волокон с помощью оптической когерентной томографии / М. Е. Швачкина, Д. Д. Яковлев, Е. Н. Лазарева, А. Б. Правдин, Д. А. Яковлев // Оптика и спектроскопия. – 2019. – Т.127, №2 – С.337-346.
7. Швачкина, М. Е. О возможности стабилизации контрактированного состояния коллагенсодержащих тканей в результате рибофлавин/УФ кросслинкинга при пониженном уровне гидратации ткани//«Известия

Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика», (направлена в печать 16.05.19).