

На правах рукописи

**БАРАНОВ Степан Андреевич**

**ДИАГНОСТИКА ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННЫХ  
СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ  
МЕТОДОМ СПЕКЛ-ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ.**

02.00.04 - Физическая химия

02.00.09 - Химия высоких энергий

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук.

Москва - 2007

Работа выполнена в лаборатории катализа и газовой электрохимии кафедры физической химии Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

академик РАН, профессор  
**Лунин Валерий Васильевич**

кандидат физико-математических наук, с.н.с.  
**Свиридов Александр Петрович**

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор  
**Фельдман Владимир Исаевич**  
Химический факультет, Московский  
Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

кандидат химических наук, доцент  
**Правдин Александр Борисович**  
Саратовский Государственный Университет  
им. Н.Г. Чернышевского

Ведущая организация: **Московская Государственная Академия  
Тонкой Химической Технологии  
им. М.В. Ломоносова**

Защита диссертации состоится «2» ноября 2007 года в «16» час. «45» мин. на заседании Диссертационного совета Д 501.001.90 по химическим наукам при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 337.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «1» октября 2007 года.

Учёный секретарь  
Диссертационного совета

кандидат химических наук



Бобылёва М.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В связи с бурным развитием новых методов лазерной коррекции формы хрящей и лазерной регенерации межпозвоночных дисков и суставных хрящей увеличивается разрыв между практическим применением этих методов и фундаментальными исследованиями. Решение этой проблемы лежит в области междисциплинарных исследований и требует проведения дополнительных исследований.

В настоящее время для коррекции формы перегородки носа, регенерации межпозвоночных дисков, гипертермии опухолевых новообразований успешно применяется умеренный локальный нагрев (до 70 - 80°C) биологических тканей лазерным излучением. Требуемый лечебный эффект достигается, когда в нагреваемом объеме биологической ткани происходят заданные условиями эксперимента (воздействия) изменения физико-химических свойств, прежде всего механических, оптических и термических. Особое научное и практическое значение приобретает мониторинг этих свойств, который позволяет управлять процессом лазерного воздействия на ткани с помощью систем обратной связи. Такой контроль значительно снижает вероятность осложнений после лазерных процедур в медицинской практике. Для мониторинга биологических тканей наиболее оптимальны неинвазивные (неразрушающие), экспрессные, высокочувствительные методы, к которым можно отнести и метод динамического измерения спеклов.

Формирование спекл-картин обычно происходит при отражении когерентного света от случайно рассеивающей среды. В результате интерференции световых лучей, пришедших от случайно распределенных рассеивателей, на экране создается случайная структура распределения интенсивности света в виде ярких и темных пятен (их и называют спеклами) — спекл-картина (Рис. 2). Если в случайно рассеивающей среде происходит изменение движения рассеивателей или изменение их физико-химического состояния, то эти изменения обязательно найдут отражение на спекл-картине. Динамика спеклов отличается высокой чувствительностью к движению внутритканевой жидкости, к изменению скорости движения рассеивателей и к структурным переходам. Так, например, неинвазивное экспрессное измерение скорости кровотока – это один из способов практического применения метода спекл-интерферометрии.

Однако при ИК лазерном нагреве биологических тканей, как правило, одновременно происходят несколько физико-химических процессов, что значительно усложняет интерпретацию динамических характеристик спекл-картин. В частности, ИК лазерный нагрев хрящей вызывает переход связанной внутритканевой воды в свободное состояние, усиливает процессы диффузии и испарения воды, приводит к денатурации белков, таких, как коллаген. Поэтому для диагностики и контроля методом спекл-интерферометрии процессов,

протекающих в биологических тканях под действием ИК лазерного излучения, необходимо было выявить характерные особенности поведения спекл-картин во время протекания изолированных друг от друга (одиночных) процессов.

Кроме характерных особенностей поведения спекл-картин при ИК лазерном нагреве, необходимо было выявить и факторы, влияющие на динамику спеклов.

Хрящевая ткань является сложным объектом для исследований из-за своего строения и состава. В ней крайне трудно разделить протекание большинства физико-химических процессов. В связи с этим становятся актуальными как проведение серии экспериментов на модельных системах для изучения заданных физико-химических процессов, так и сопоставление результатов этих экспериментов с результатами экспериментов, полученных для интактной (незатронутой) хрящевой ткани. В частности, для моделирования процессов диффузии и испарения воды была предложена модельная система “фильтровальная бумага – вода”, для моделирования процесса денатурации коллагена – модельная система “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой”.

При изучении динамики спеклов важны и способы доставки изображения. Для внедрения метода спекл-интерферометрии в хирургическую практику необходимо обеспечить передачу спекл-картин из труднодоступных зон (полость носа, суставная сумка, межпозвоночный диск). Передача изображения осуществляется посредством оптических жгутов, какими обычно пользуются в эндоскопии. Оптический жгут состоит из множества тонких оптических волокон, каждое из которых независимо передает интенсивность света с входной поверхности жгута на выходную. Для расширения области практического применения спекл-интерферометрии важно сопоставить результаты измерения динамики спеклов с помощью оптического жгута с результатами, полученными регистрацией спекл-картин напрямую.

**Цель работы.** Целью данной работы являлось выявление и исследование взаимосвязей динамического поведения спекл-картин и физико-химических процессов, протекающих при ИК лазерном нагреве хрящей, в частности, при денатурации коллагена, диффузии и испарении воды, а также развитие неинвазивного (бесконтактного) метода диагностики и контроля состояния хрящевой ткани при ИК лазерном нагреве на основе спекл-интерферометрического анализа. В связи с поставленной целью работа была направлена на решение следующих задач:

1. Создание методики спекл-интерферометрического анализа. Разработка аппаратной схемы эксперимента для проведения в режиме реального времени с осуществлением системы обратной связи спекл-интерферометрического анализа структурных изменений в веществах при умеренном ИК лазерном нагреве.

2. Исследование динамики спеклов при структурном переходе “твердое тело - жидкость” (плавление низкомолекулярных органических соединений). Определение характерных зависимостей статистических функций спекл-картин для данного процесса.

3. Исследование динамики спеклов при диффузии и испарении воды, вызванных умеренным ИК лазерным нагревом, как в случае модельной системы “фильтровальная бумага - вода”, так и в случае интактной хрящевой ткани. Определение характерных зависимостей статистических функций спекл-картин для данного процесса.

4. Исследование динамики спеклов при структурных изменениях, вызванных денатурацией коллагена при умеренном ИК лазерном нагреве, в модельной системе - “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой”. Определение характерных зависимостей статистических функций спекл-картин для данного процесса.

5. Исследование динамики спеклов при структурных изменениях, вызванных умеренным ИК лазерным нагревом, в интактных (неповрежденных) хрящевых тканях. Сопоставление полученных результатов с результатами от модельных систем. Определение характерных зависимостей статистических функций спекл-картин для данного процесса.

6. Изучение возможности регистрации с помощью оптического жгута динамики спеклов из скрытых для прямого наблюдения участков. Сопоставление результатов измерения динамики спеклов с помощью оптического жгута с результатами, полученными съемкой спекл-картин напрямую.

**Научная новизна** диссертационной работы состоит в следующем:

1. Впервые была представлена методика проведения спекл-интерферометрического анализа при умеренном ИК лазерном нагреве с обеспечением временной и пространственной синхронизации измерительных приборов, объединенных в систему с обратной связью в режиме реального времени, для регистрации структурных превращений в веществах при нагреве.

2. Впервые показана и изучена чувствительность статистических функций спекл-картин к структурным переходам, вызванным фазовыми переходами первого рода, в частности, к процессу плавления низкомолекулярных органических соединений.

3. Впервые выявлены и изучены факторы, приводящие к изменениям динамики спеклов при умеренном ИК лазерном нагреве интактной (незатронутой) хрящевой ткани. Показано, что основными факторами, влияющими на статистические функции спекл-полей при умеренном ИК лазерном нагреве биологических тканей, являются диффузия и испарение воды, денатурация коллагена.

4. Впервые была показана возможность использования оптоволоконного жгута для регистрации динамики спеклов из скрытых для прямого наблюдения участков, что может найти широкое применение в медицинских системах.

**Практическая значимость** диссертационной работы состоит в следующем:

1. Создан комплекс программ и предложена аппаратная схема проведения спекл-интерферометрического анализа в режиме реального времени с системой обратной связи для управляемого лазерного нагрева.

2. На основе найденных закономерностей показана возможность контроля мощности умеренного ИК лазерного излучения методом спекл-интерферометрии для предотвращения денатурации коллагена в хрящевых тканях, что может найти широкое применение в медицинских системах.

3. Показана возможность использования метода спекл-интерферометрии для неинвазивной (бесконтактной), экспрессной регистрации структурных изменений, вызванных фазовыми переходами первого рода, в частности, плавления низкомолекулярных органических соединений.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были доложены на международных конференциях “Saratov Fall Meeting: Coherent Optics of Ordered and Random Media IV” (Саратов, Россия, 2003, 2005), на конференции “IV Съезд фотобиологов России” (Саратов, Россия, 2005), на юбилейной конференции, посвященной 25-летию ИПЛИТ РАН и 70-летию академика Е.П. Велихова (Шатура, Московская область, 2005), на международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам (Москва, Россия, 2005).

Результаты работы включены в книгу “Лазерная инженерия хрящей”<sup>1</sup>.

**Публикации.** По материалам работы опубликованы 5 статей и 2 тезиса докладов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения (три главы), выводов, списка цитируемой литературы и приложения.

Работа изложена на 146 страницах машинописного текста и содержит 66 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 142 наименования.

---

<sup>1</sup> Лазерная инженерия хрящей. / Под ред. Баграташвили В.Н., Соболев Э.Н., Шехтер А.Б. М: ФИЗМАТЛИТ, 2006. 488 с.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

**Во введении** обоснована актуальность диссертационной темы, сформулирована цель работы, приведены основные положения, отражена научная новизна и практическая значимость, представлены структура и общее содержание работы.

**В первой главе** на основе анализа научной литературы обсуждаются:

- ) строение и структура коллагенсодержащих хрящевых тканей;
- ) протекание различных физико-химических процессов в коллагенсодержащих биологических тканях при умеренном ИК лазерном нагреве, в том числе и денатурация коллагена;
- ) методы регистрации степени денатурации коллагена;
- ) преимущества оптических методов контроля состояния биологических тканей;
- ) основы спекл-интерферометрического метода и его способность регистрировать структурные изменения и движение рассеивателей.

На основе проведенного анализа научной периодики было высказано предположение о способности метода спекл-интерферометрии регистрировать структурные переходы в биологической ткани при нагреве. Так, в работе Зимнякова<sup>2</sup> впервые была показана возможность регистрации модификаций коллагенсодержащих тканей методом спекл-интерферометрии, была выявлена высокая чувствительность статистики спекл-картин к нагреву тканей. В этой работе было высказано предположение, что динамика спеклов должна отличаться высокой чувствительностью к движению внутритканевой жидкости, её испарению и к денатурации белков. Тем не менее, анализ литературных источников показал отсутствие научных данных, связывающих изменение статистики спекл-картин с одиночными, изолированными друг от друга, процессами, такими, например, как испарение, плавление, денатурация, что важно для контроля состояния при нагреве как биологических тканей, так и более простых низкомолекулярных соединений. Не были также детально изучены факторы, приводящие к изменению статистики спекл-картин в случае нагрева коллагенсодержащих тканей. Таким образом, требовалось провести дополнительные исследования, расширяющие возможность применения метода спекл-интерферометрии для анализа и контроля структурных переходов при нагреве как в биологических объектах, так и в низкомолекулярных органических соединениях. Также было необходимо разработать методику проведения спекл-интерферометрического анализа для анализа структурных

---

<sup>2</sup> Zimnyakov D.A., Agafonov D.N., Sviridov A.P., Omel'chenko A.I., Kuznetsova L.V., Bagratashvili V.N. Speckle-contrast monitoring of tissue thermal modification. // Applied Optics, 2002, v.41(28), pp.5989-5996.

изменений, происходящих в веществах при умеренном ИК лазерном нагреве, аппаратную схему и комплекс программ.

**Во второй главе** были впервые предложены и описаны: аппаратная схема (Рис. 1) и методика проведения спекл-интерферометрического анализа для регистрации структурных превращений, происходящих в веществах при нагреве.

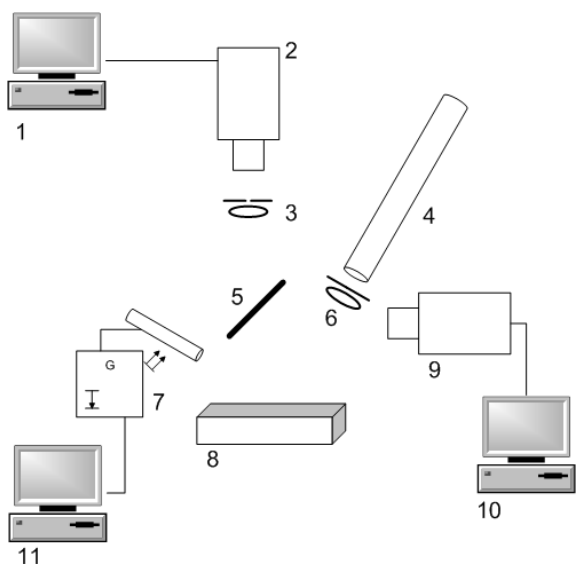


Рисунок 1. Схема экспериментальной установки. 1,10,11 - компьютеры; 2 - ПЗС камера; 3 - система линз с диафрагмой; 4 - He-Ne лазер; 5 - ИК-зеркало; 6 - система линз с поляризатором света; 7 - ИК нагревающий лазер; 8 - образец; 9 - ИК-камера.

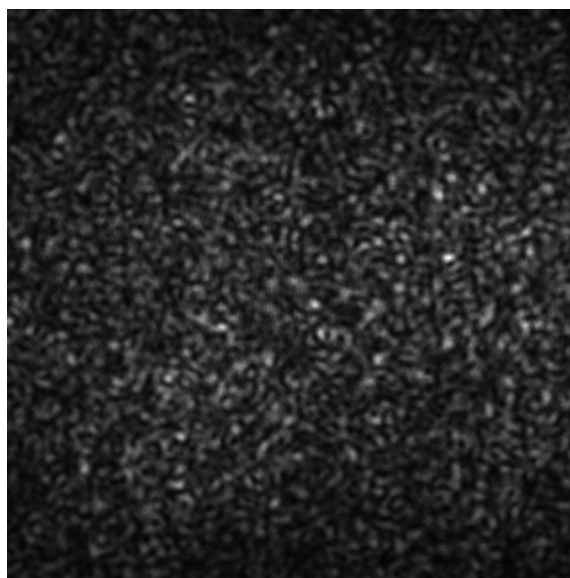


Рисунок 2. Пример спекл-картины, регистрируемой ПЗС камерой. Каждой точке этого изображения соответствует собственное значение интенсивности света. Набор этих интенсивностей использовался для расчета статистических функций спекл-картин.

Предложенная схема (Рис. 1) базируется на бесконтактных, экспрессных способах регистрации оптических и термических данных с помощью ПЗС и ИК радиометрической камер, а также включает в себя использование лазера как бесконтактного источника нагрева. Все элементы схемы, с помощью которых производится сбор данных, были впервые объединены в единую информационную систему, позволяющую в режиме реального времени организовать обратную связь для управления мощностью ИК лазерного излучения, что представляется крайне важным для последующего практического использования, например, при проведении хирургических процедур на хрящевых тканях.

Спекл-картины (Рис. 2), регистрируемые ПЗС камерой, использовались для расчета статистических функций спекл-картин, таких, как средняя интенсивность света, контраст (автокорреляционная функция),



кросскорреляционный коэффициент Пирсона (декорреляционная функция) по следующим уравнениям:

$$\langle I_k \rangle = \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k, \text{ где } \langle I_k \rangle - \text{ значение средней интенсивности для кадра}$$

$k$ ,  $I_k$  – значение интенсивности в точке кадра  $k$  с координатами  $\{m, n\}$ ;

$$V_k = \frac{\sigma_{I_k}}{\langle I_k \rangle} = \frac{\sqrt{\langle I_k \rangle^2 - \langle I_k^2 \rangle}}{\langle I_k \rangle} = \frac{\sqrt{\left[ \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k \right]^2 - \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k^2}}{\frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k}, \text{ где } V_k - \text{ значение}$$

функции контраста, вычисляемое для каждого кадра  $k$ ,  $M$  – ширина спекл-картин в пикселях,  $N$  – высота спекл-картин в пикселях,  $I_k$  – значение интенсивности в точке кадра  $k$  с координатами  $\{m, n\}$ ;

$$D_{k,l} = \frac{\text{cov}\langle I_k, I_l \rangle}{\sigma_{I_k} \sigma_{I_l}} = \frac{\langle I_k I_l \rangle - \langle I_k \rangle \cdot \langle I_l \rangle}{\sqrt{\langle I_k \rangle^2 - \langle I_k^2 \rangle} \cdot \sqrt{\langle I_l \rangle^2 - \langle I_l^2 \rangle}} =$$

$$= \frac{\frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k I_l - \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k \cdot \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_l}{\sqrt{\left[ \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k \right]^2 - \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k^2} \cdot \sqrt{\left[ \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_l \right]^2 - \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_l^2}}, \text{ где } D_{k,l} -$$

значение кросскорреляционного коэффициента Пирсона, вычисляемое для пары кадров  $k$  и  $l$ .

Предложенные математические функции использовались в качестве основы статистического рассмотрения динамики спеклов.

Исходя из данных ИК термографа (Рис. 3), рассчитывали интегральную величину поверхностной температуры.

Предложенная схема (Рис. 1) позволяет организовать сбор спекл-интерферометрических и температурных данных как с временной, так и с пространственной синхронизацией. Это, в свою очередь, позволяет перейти от рассмотрения временных зависимостей статистических функций спекл-картин к температурным зависимостям, что необходимо для изучения структурных изменений, происходящих в веществах при нагреве. Анализ зависимостей статистических функций спекл-картин от температуры нагрева был выбран для

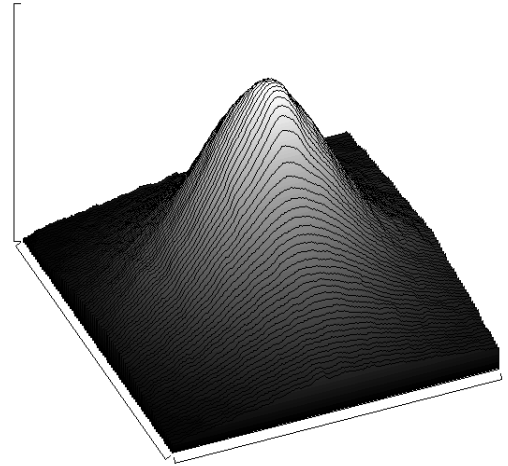


Рисунок 3. Пример температурного поля участка поверхности, регистрируемого ИК термокамерой. По вертикальной оси отложены значения температуры.

качественного описания чувствительности спеклов к процессу нагрева сложных биологических объектов и простых низкомолекулярных органических соединений.

Во второй части второй главы были рассмотрены основные экспериментальные температурные и временные закономерности изменения статистических функций спекл-картин (Рис. 4-7). Эти закономерности служили верификацией (критериями верности) проведения спекл-интерферометрического анализа для предотвращения возможных ошибок при проведении исследований. На основе данных зависимостей (Рис. 4-7) были представлены и описаны: алгоритм проведения спекл-интерферометрического анализа, алгоритм обработки экспериментальных данных и расчета статистических функций спекл-картин.

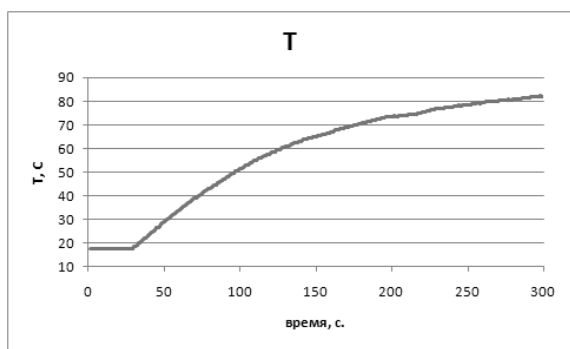


Рисунок 4. Характерная зависимость температуры от времени нагревания.

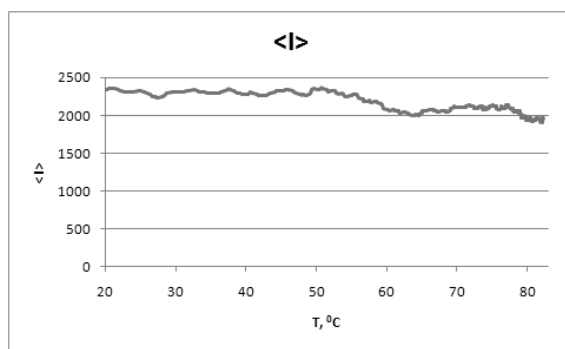


Рисунок 5. Характерная зависимость средней интенсивности спекл-картин от температуры нагрева.

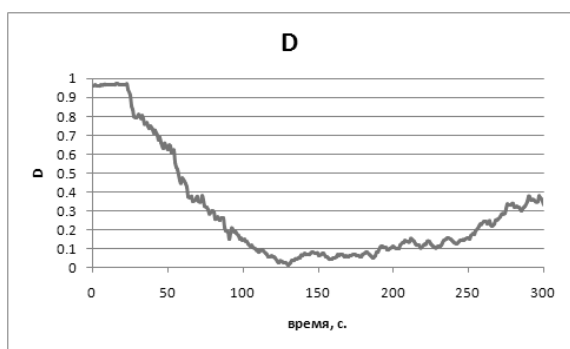


Рисунок 6. Характерная зависимость значений кросскорреляционного коэффициента Пирсона спекл-картин от времени нагрева.

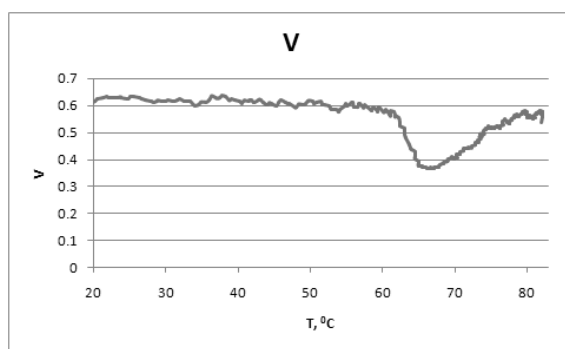


Рисунок 7. Характерная зависимость значений функции контраст спекл-картин от температуры нагрева.

Таким образом, впервые была создана и отработана методика спекл-интерферометрического анализа, позволяющая регистрировать структурные изменения при нагреве веществ. Был создан комплекс программ и предложена аппаратная схема проведения спекл-интерферометрического анализа в режиме

реального времени с системой обратной связи для управления мощностью лазерного излучения.

**В третьей главе** была исследована динамика спеклов при нагреве низкомолекулярных органических соединений. Данное исследование необходимо для экспериментального выявления основных закономерностей в изменении статистики спекл-картин при структурных переходах, вызванных фазовыми переходами первого рода, таких как переход “твердое тело - жидкость”. Из анализа литературы были приведены научные данные о практическом применении метода спекл-интерферометрии для регистрации начала плавления химических соединений и для измерения коэффициента теплового расширения. Тем не менее, литературный поиск показал отсутствие данных, связывающих изменение статистики спекл-картин при структурных переходах, вызванных фазовыми переходами первого рода.

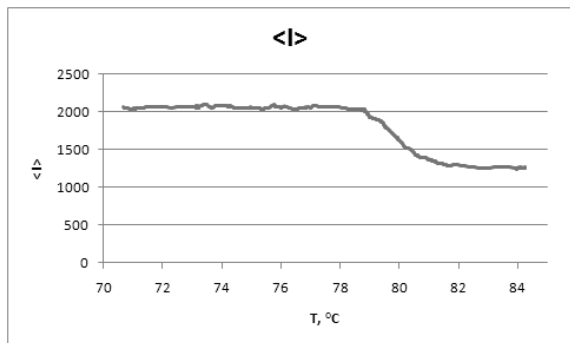


Рисунок 8. Зависимость значений функции средней интенсивности спекл-картин от температуры при нагреве акриламида.

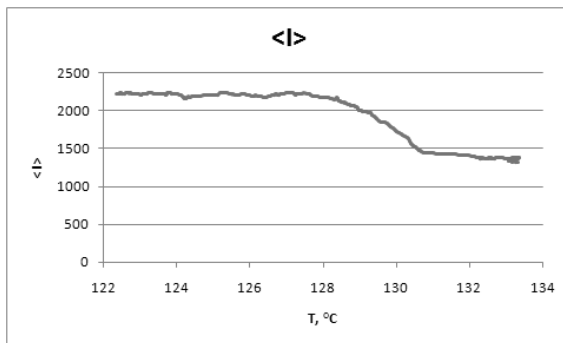


Рисунок 9. Зависимость значений функции средней интенсивности спекл-картин от температуры при нагреве коричневой кислоты.

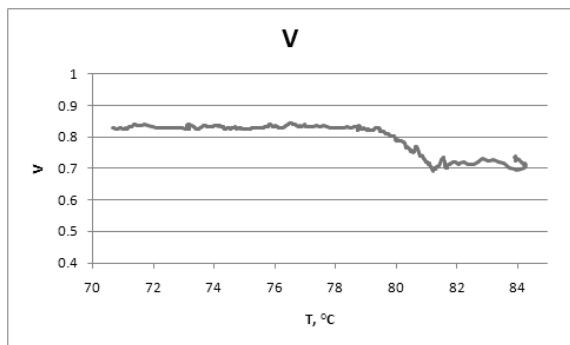


Рисунок 10. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве акриламида.

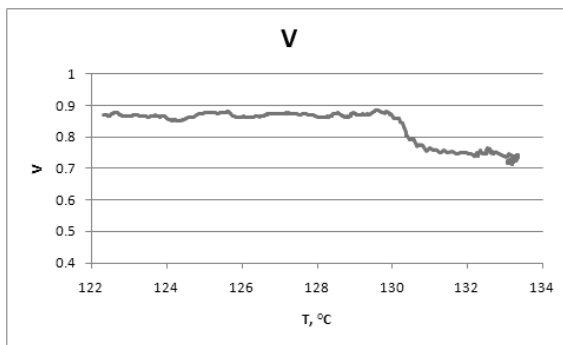


Рисунок 11. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве коричневой кислоты.

Низкомолекулярные органические соединения акриламид и коричневая кислота были выбраны в качестве объектов исследования, так как они в порошкообразном состоянии обладают хорошо отражающей поверхностью,

плавятся без химического разложения, без смены окраски и при достаточно низких температурах. Все эти критерии были необходимы для нивелирования побочных процессов, а также для моделирования умеренного ИК лазерного нагрева. Нагрев веществ проводили на электрической плитке с контролируемым градиентом температуры. Во время нагрева регистрировали спекл-картины для последующего расчета статистических функций спекл-картин.

На рисунках 8 и 9 приведены графики зависимостей значений функционала средней интенсивности спекл-картин от температуры при нагреве акриламида и коричной кислоты соответственно. На основе анализа приведенных графиков был сделан вывод, что средняя интенсивность спекл-картин флуктуирует незначительно на всем протяжении нагрева ниже температуры плавления веществ, но при достижении точки плавления за несколько градусов (2-4 °С) она начинает равномерно падать, достигая минимума после прохождения точки плавления. Такое поведение функции средней интенсивности спекл-картин объясняется появлением жидкой фазы и постепенным исчезновением твердой фазы, что приводит к уменьшению отражения от поверхности исследуемых веществ.

На рисунках 10 и 11 приведены зависимости значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве акриламида и коричной кислоты соответственно. На основе анализа приведенных графиков был сделан вывод, что контраст спекл-картин флуктуирует незначительно на всем протяжении нагрева ниже температуры плавления веществ, но при достижении точки плавления за несколько градусов (2-4 °С) он начинает равномерно падать, достигая минимума после прохождению точки плавления.

Падение контраста спекл-картин при достижении температуры плавления объясняется увеличением скорости динамических рассеивателей вследствие теплового Броуновского движения, а также изменением оптических свойств самой отражающей поверхности из-за образования новых и исчезновения старых фаз, что согласуется с литературными данными.

На основе полученных результатов, описанных в третьей главе, был сделан вывод о чувствительности статистики спекл-картин к структурному переходу, вызванному фазовым переходом “твердое тело - жидкость” низкомолекулярных органических соединений. Были выявлены основные закономерности в изменениях статистических функций спекл-картин до - и во время структурного перехода, вызванного фазовым переходом первого рода при нагреве.

**В четвертой главе** исследовалась динамика спеклов при нагреве биологической ткани – коллагенсодержащей хрящевой ткани перегородки носа животных. Так как биологическая ткань является сложным объектом для изучения и в ней одновременно могут протекать несколько физико-химических

процессов при умеренном ИК лазерном нагреве, то было важно установить основные факторы, влияющие на чувствительность спеклов при нагреве. На основе анализа литературных источников были определены основные физико-химические процессы, вызывающие в биологической ткани значительные структурные изменения, которые, в свою очередь, могут значительно влиять на статистику спекл-картин. К основным процессам, протекающим при лазерном нагреве до 80°C и приводящим к изменениям как приповерхностного слоя, так и поверхности хрящевой ткани, были отнесены:

- ) диффузия и испарение воды с поверхности биологической ткани;
- ) структурные изменения в коллаген-протеогликановом матриксе хрящевой ткани.

Так, для установления взаимосвязи между диффузией, испарением воды и динамикой спеклов были поставлены эксперименты с нагревом ИК лазером слегка смоченной фильтровальной бумаги (модельная система) и с недеструктивным нагревом ИК лазером хрящевой ткани при низких температурах.

В первой главе настоящей работы (обзоре литературы) отмечается, что хрящевая ткань имеет сложную структуру, в которой, тем не менее, выделяют два основных компонента - протеогликановую и коллагеновую трехмерные надмолекулярные сетки. Тепловое воздействие приводит к денатурации белков, входящих в состав хряща, главным образом коллагена, который является основным компонентом межклеточного матрикса хрящевой ткани. При этом коллагеновые фибриллы являются “каркасом” хрящевой ткани, поэтому структурные изменения матрикса хрящевой ткани, происходящие при ИК лазерном нагреве и чувствительные для спекл-интерферометрии, в первую очередь были связаны с денатурацией коллагена. Для проверки этого предположения было проведено физико-химическое исследование на модельной системе – “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой”, в которой содержится только одна трехмерная сетка - коллагеновая.

Результаты, полученные на описанных выше модельных системах, “фильтровальная бумага - вода” для выявления влияния воды и “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой” для выявления влияния денатурации коллагена, были сопоставлены с результатами, полученными при ИК лазерном нагреве интактных образцов хряща.

При изучении динамики спеклов важны и способы доставки изображения. Для внедрения метода спекл-интерферометрии в хирургическую практику необходимо обеспечить передачу спекл-картин из труднодоступных зон (полость носа, суставная сумка, межпозвоночный диск). Передача изображения осуществляется посредством оптических жгутов, какими обычно пользуются в эндоскопии. Оптический жгут состоит из множества тонких

оптических волокон, каждое из которых независимо передает интенсивность света с входной поверхности жгута на выходную. Для обоснования возможности применения оптического жгута в измерениях динамики спеклов было важно сопоставить результаты измерения динамики спеклов с помощью оптического жгута с результатами, полученными съемкой спекл-картин напрямую.

В четвертой главе приводятся методики приготовления интактных образцов хрящевой ткани, ферментативной обработки хрящевой ткани для получения образцов с разрушенной протеогликановой системой на основе действия трипсина, относящегося к классу сериновых протеиназ, методика количественного анализа содержания коллагена на основе определения содержания гидроксипролина (Нур), коллаген-специфической аминокислоты, методика проведения ДСК анализа (дифференциальная сканирующая калориметрия).

В четвертой главе также представлены результаты экспериментов и их обсуждение, краткое содержание которых изложено ниже.

#### 1. Динамика спеклов при диффузии и испарении воды в биологических тканях в процессе ИК лазерного нагрева.

Как уже отмечалось выше, при нагреве биологической ткани происходят диффузия и испарение воды. Это может приводить к изменению спекл-картин и их статистики. При анализе литературы не были обнаружены научные данные по статистике спекл-картин при диффузии или испарении воды. Поэтому было необходимо провести исследование для выяснения характера чувствительности статистики спекл-картин к диффузии и испарению воды при ИК лазерном нагреве, как в случае нагрева модельной системы “фильтровальной бумаги – вода”, так и в случае нагрева биологической ткани.

На рисунках 12 и 14 приведены графики зависимостей значений функции средней интенсивности спекл-картин от температуры при нагреве слегка смоченной фильтровальной бумаги до 75°C и интактных образцов хрящевой ткани до 50°C соответственно. На основе анализа приведенных графиков был сделан вывод, что средняя интенсивность спекл-картин медленно растет на всем протяжении нагрева. Такой рост средней интенсивности спекл-картин объясняется увеличением числа рассеивателей и появлением воды на поверхности объектов (наблюдается визуально через систему с большим увеличением), что приводит к увеличению отражения лазерного излучения от поверхности объекта. Рост средней интенсивности спекл-картин интактной хрящевой ткани менее выражен, чем в случае с фильтровальной бумагой. Это обусловлено более сильным связыванием (удержанием) воды матриксом биологической ткани по сравнению с фильтровальной бумагой и меньшей пористостью хряща.

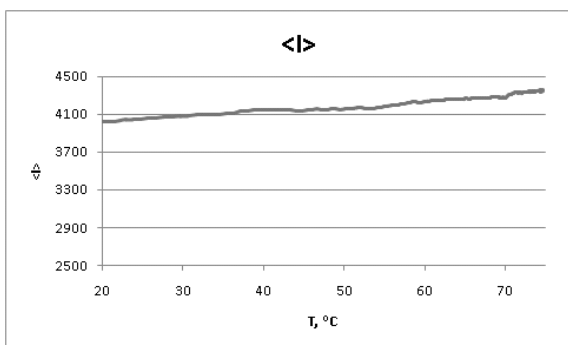


Рисунок 12. Зависимость значений функции средней интенсивности спекл-картин от температуры при нагреве слегка смоченной фильтровальной бумаги.

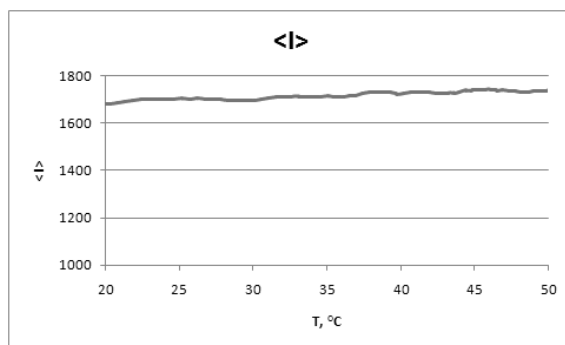


Рисунок 13. Зависимость значений функции средней интенсивности спекл-картин от температуры при нагреве образцов intactной хрящевой ткани до 50°C.

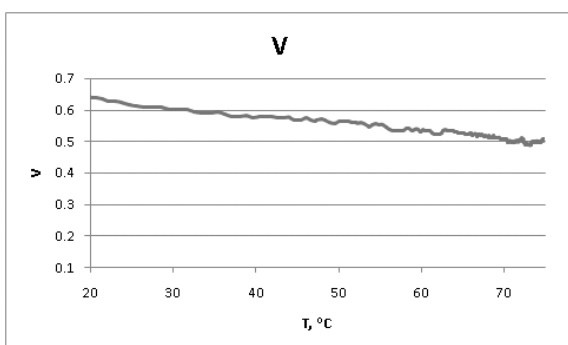


Рисунок 14. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве слегка смоченной фильтровальной бумаги.

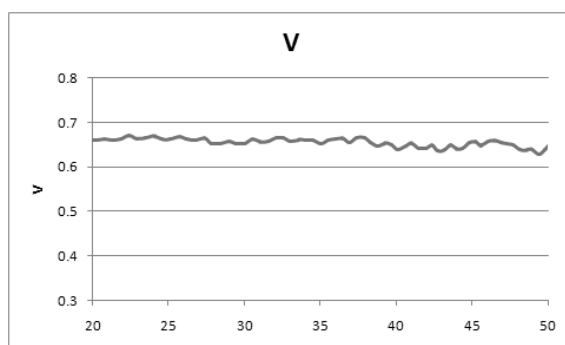


Рисунок 15. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов intactной хрящевой ткани до 50°C.

На рисунках 13 и 15 приведены графики зависимостей значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве слегка смоченной фильтровальной бумаги до 75°C и intactных образцов хрящевой ткани до 50°C соответственно. На основе анализа приведенных графиков был сделан вывод, что контраст спекл-картин медленно уменьшается на всем протяжении ИК лазерного нагрева. Это уменьшение объясняется увеличением значений функций средней интенсивности спекл-картин, так как контраст спекл-картин обратно пропорционален средней интенсивности. Кроме того, это наблюдаемое уменьшение контраста спекл-картин можно связать как с увеличением скорости рассеивателей из-за роста температуры, так и с увеличением деформаций поверхности, что согласуется с литературными данными.

Таким образом, в настоящей работе была установлена чувствительность статистики спекл-картин к диффузии и испарению воды, как в случае нагрева модельной системы “фильтровальная бумага - вода”, так и в случае ИК лазерного нагрева intactной хрящевой ткани. Был обнаружен сходный характер изменений статистических параметров спекл-картин этих систем.

## 2. Динамика спеклов при ИК лазерном нагреве хрящевой ткани, обработанной трипсином.

В хрящевой ткани белок коллаген образует трехмерную надмолекулярную решетку – сетку. Денатурация коллагена приводит к структурным изменениям в трехмерной коллагеновой сетке. По нашему предположению, эти структурные изменения обязательно найдут отражение на изменении статистики спекл-картин. При анализе литературы не были обнаружены научные данные по статистике спекл-картин при структурных изменениях трехмерных надмолекулярных решеток на основе белков.

Для изучения связи процесса денатурации коллагена с изменением статистики спекл-картин биологической ткани при ИК лазерном нагреве необходимо было провести исследование на модельной системе “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой”, содержащей только одну неразрушенную сетку – коллагеновую.

На рисунке 16 приведены температурные кривые для некоторых образцов. На рисунках 17-19 приведены типичные зависимости функции контраста спекл-картин от температуры для образцов, подвергшихся ИК лазерному воздействию в разных режимах нагрева. Отличительной особенностью таких зависимостей является существование диапазонов температур, в которых проявляется резкое падение автокорреляционной функции (контраст) спекл-картин. В случае ИК лазерного нагрева в режимах 2 и 3 наблюдаются два уменьшения контраста спекл-картин в диапазонах температур 35-45°C и 55-75°C, а для образцов, нагретых в режиме 1, только одно - при 35-45°C.

Было выявлено, что второе уменьшение контраста спекл-картин в диапазонах температур 55-75°C (2-ой процесс на Рис. 18, 19) связано с полной денатурацией коллагена II хрящевой ткани (полное растворение в растворе трипсина). Первое уменьшение контраста спекл-картин в районе температур 35-45°C (1-ый процесс на Рис. 17-19) наблюдалось для всех образцов хрящевой ткани, обработанной трипсином. При этих температурах (35-45°C) на поверхности образцов хрящевой ткани визуально наблюдалось появление воды из-за движения жидкости в матриксе ткани. Данный результат полностью соотносится с результатами, полученными при ИК лазерном нагреве как модельной системы “фильтровальная бумага - вода”, так и интактной хрящевой ткани до 50°C. Более значительное уменьшение контраста спекл-картин (1-ый процесс на Рис. 17-19) образцов модельной системы “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой” по сравнению с аналогичным уменьшением контраста спекл-картин образцов интактной ткани объясняется тем, что в связывании (удержании) воды в хрящевой ткани значительную роль играет протеогликановая система, которая для модельной системы была разрушена действием трипсина.



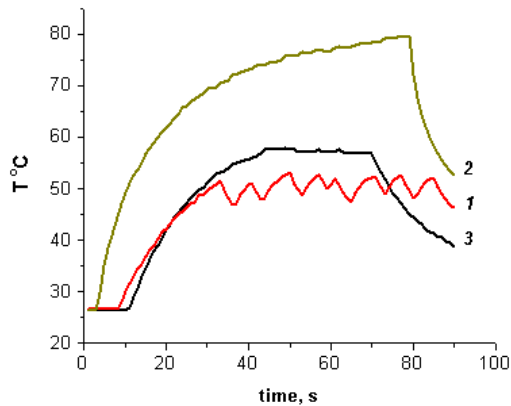


Рисунок 16. Зависимости температуры ИК лазерного нагрева от времени облучения образцов хрящевой ткани, обработанной трипсином, при различных режимах нагрева.

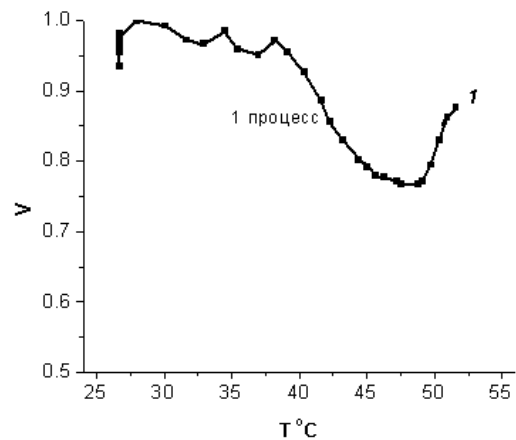


Рисунок 17. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов хрящевой ткани, обработанной трипсином, до 53°C. Длительность нагревания свыше 45°C – 70 секунд (режим 1). После нагрева образец не растворился в трипсине.

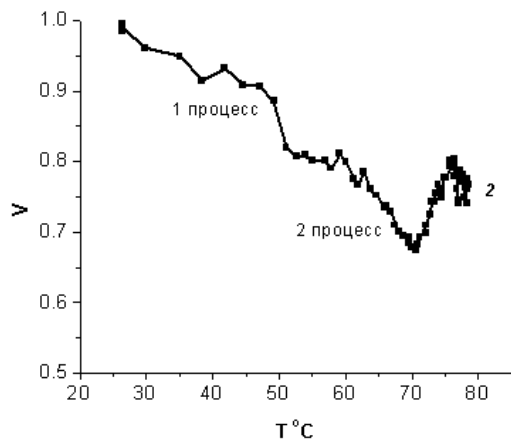


Рисунок 18. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов хрящевой ткани, обработанной трипсином, до 80°C. Длительность нагревания свыше 55°C – 70 секунд (режим 2). После нагрева образец растворился в трипсине.

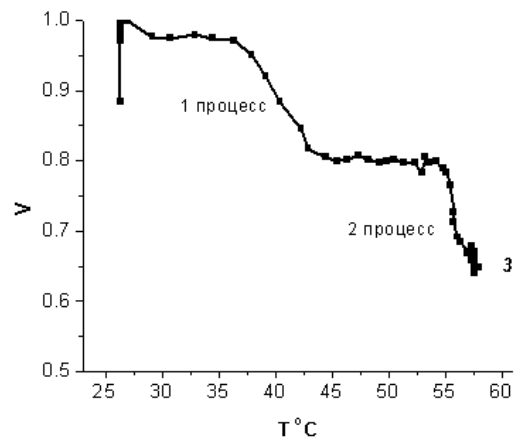


Рисунок 19. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов хрящевой ткани, обработанной трипсином, до 57°C, длительность нагревания свыше 55°C – 35 секунд (режим 3). После нагрева образец растворился в трипсине.

Отметим, что для образцов, нагретых в режиме 3 (Рис. 19), оба уменьшения контраста спекл-картин наглядно разделены на температурных зависимостях. Это разделение объясняется меньшей скоростью ИК лазерного нагрева, которое, в свою очередь, приводит к временному разделению двух

процессов: движение и испарение жидкости и денатурация коллагена - в случае модельной системы “хрящевая ткань, обработанная трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой”.

Таким образом, эксперименты, поставленные на препаратах хрящевой ткани с разрушенной протеогликановой подсистемой, убедительно доказали возможность регистрации структурных изменений в коллагенсодержащих тканях, вызванных денатурацией коллагена, методом спекл-интерферометрии при ИК лазерном нагреве.

### 3. Динамика спеклов при ИК лазерном нагреве интактной хрящевой ткани.

Необходимо было сопоставить результаты экспериментов изучения динамики спеклов при нагреве интактной хрящевой ткани с уже полученными результатами экспериментов, в которых изучалась динамика спеклов при диффузии, испарении воды и денатурации коллагена в хрящевой ткани, обработанных трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой. Данное исследование было проведено впервые и позволило установить основные факторы, влияющие на статистику спекл-картин при ИК лазерном нагреве биологической ткани.

На рисунке 20 приведены температурные кривые для некоторых образцов. Степень денатурации для образцов определялась биохимическим методом. На представленных кривых (Рис. 21-23) видно, что в значительной степени денатурация протекала только в тех образцах, для которых наблюдалось существенное уменьшение контраста спекл-картин после ИК лазерного нагрева свыше 55-57°C (Рис. 22, 23).

Кроме определения степени денатурации коллагена биохимическим методом, использовался метод ДСК (дифференциальная сканирующая калориметрия). ДСК анализ подтвердил, что ИК лазерная обработка интактной хрящевой ткани не приводит к полной денатурации коллагена, что также согласуется с литературными данными. Однако тепловой эффект, связанный с денатурацией коллагена в образцах, нагретых ИК лазерным излучением свыше 60°C, значительно меньше теплового эффекта необлученных образцов. Это свидетельствует о модификации коллагена II в образцах, нагретых ИК лазерным излучением до температур 60°C и выше.

На основании экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

- ) денатурация коллагена имеет пороговый характер по температуре: денатурация протекает только при температуре выше 55-57°C;
- ) степень денатурации увеличивается при увеличении времени нагрева.

На всех приведенных температурных зависимостях контраста спекл-картин интактных образцов хрящевой ткани наблюдается постепенное уменьшение значений функции контраста спекл-картин с ростом температуры до момента начала денатурации коллагена II. И хотя это падение выражено

менее, чем в случае с хрящевой ткани, обработанной трипсином, оно также связано с диффузией и испарением воды, как и при неразрушающем нагреве интактной хрящевой ткани.

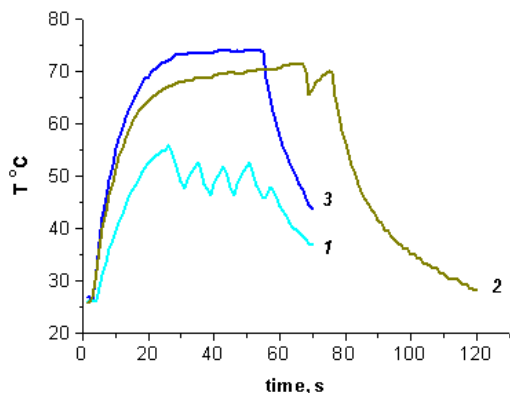


Рисунок 20. Зависимости температуры ИК лазерного нагрева от времени облучения образцов интактной хрящевой ткани при различных режимах нагрева.

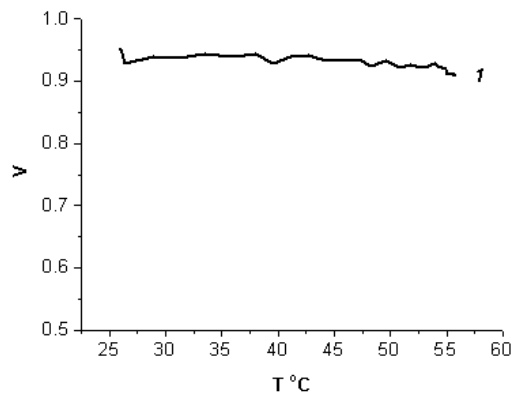


Рисунок 21. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов интактной хрящевой ткани до 57°C, длительность нагревания свыше 50°C – 15 секунд (режим 1). Степень денатурации после нагрева – 4,9%.

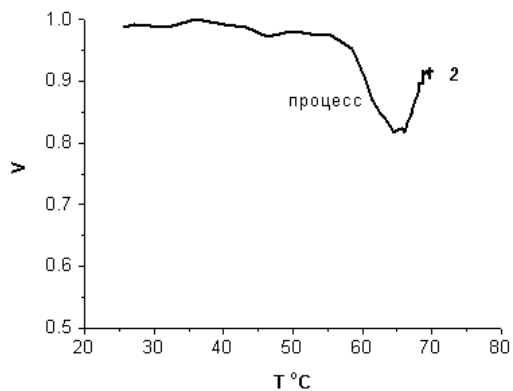


Рисунок 22. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов интактной хрящевой ткани до 76°C, длительность нагревания свыше 60°C – 60 секунд (режим 2). Степень денатурации после нагрева – 14,3%.

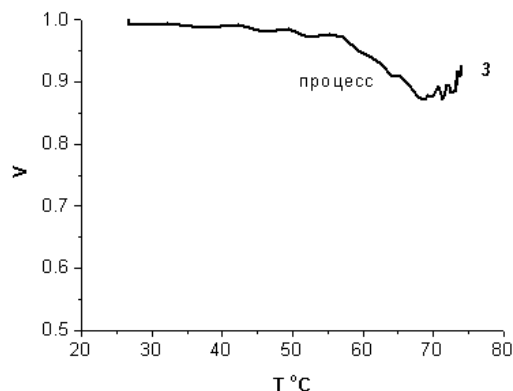


Рисунок 23. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве образцов интактной хрящевой ткани до 76°C, длительность нагревания свыше 60°C – 45 секунд (режим 3). Степень денатурации после нагрева – 9%.

Таким образом, эксперименты, поставленные на препаратах интактной хрящевой ткани, также убедительно показали возможность регистрации структурных изменений белков (денатурация коллагена), диффузии и испарения воды методом спекл-интерферометрии при ИК лазерном нагреве.

Были установлены основные факторы, приводящие к изменению динамики спеклов при ИК лазерном нагреве интактной хрящевой ткани: денатурация коллагена, диффузия и испарение воды.

#### 4. Использование оптоволоконного жгута для регистрации спекл-картин.

Препараты интактной хрящевой ткани подвергались ИК лазерному нагреву с одновременной регистрацией спекл-картин через оптоволоконный жгут. Образцы нагревались лазером до температур примерно 80°C.

На рисунке 24 приведена характерная зависимость функции контраста спекл-картин от температуры образцов интактной биологической ткани, подвергшихся ИК лазерному воздействию. Отличительной особенностью таких зависимостей является существование диапазонов температур, в которых проявляется резкое падение автокорреляционной функции (контраст). В случае ИК лазерного нагрева наблюдались два таких падения в диапазонах температур 35-45°C и 55-75°C.

При использовании оптоволоконного жгута в случае ИК лазерной обработки интактной хрящевой ткани более отчетливо видно падение функции контраста спекл-картин в районе температур 35-55°C, что соответствует поведению функции контраста спекл-картин при нагревании образцов хряща, предварительно обработанных трипсином. Это объясняется дополнительным увеличением линзы, установленной перед жгутом, из-за чего процесс образования диффузии и испарения воды стал более заметным.

Эксперименты с оптическим жгутом показали, что измерения оптических свойств облучаемых биологических тканей становятся возможными и в тех случаях, когда хрящевая ткань скрыта от прямого визуального наблюдения, например, в носовой полости (перегородка носа), в суставных сумках или между позвонками, без изменения основных закономерностей поведения функции контраста спекл-картин. Все статистические характеристики спекл-картин, полученные с использованием оптического жгута, совпали с соответствующими характеристиками, полученными без использования жгута.

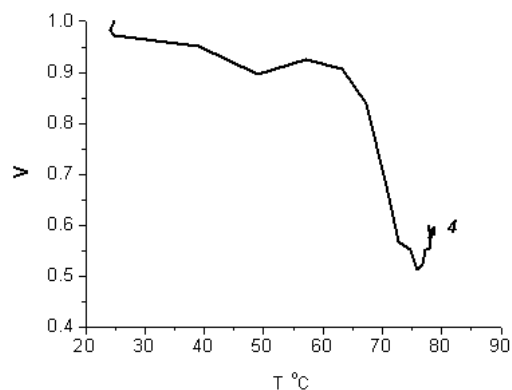


Рисунок 24. Зависимость значений функции контраста спекл-картин от температуры при нагреве интактных образцов хрящевой ткани до 82°C. Регистрация спекл-картин происходила через оптоволоконный жгут.

## ВЫВОДЫ.

1. Впервые создана и отработана методика спекл-интерферометрического анализа, позволяющая регистрировать структурные изменения при нагреве веществ. Создан комплекс программ и предложена аппаратная схема проведения спекл-интерферометрического анализа в режиме реального времени с системой обратной связи для управления мощностью лазерного излучения.

2. Впервые показана чувствительность статистики спекл-картин к структурным переходам, вызванным фазовыми переходами первого рода, на примере плавления низкомолекулярных органических соединений. Установлены характерные зависимости в изменении статистики спекл-картин для данного процесса.

3. Впервые показана чувствительность статистики спекл-картин к диффузии и испарению воды как в случае модельной системы “фильтровальная бумага – вода”, так и в случае интактной хрящевой ткани. Установлены характерные зависимости в изменении статистики спекл-картин для данного процесса.

4. Впервые показана чувствительность статистики спекл-картин к структурным изменениям в хрящевой ткани, обработанной трипсином, с разрушенной протеогликановой подсистемой, вызванным денатурацией коллагена при лазерном нагреве. Установлены характерные зависимости в изменении статистики спекл-картин для данного процесса.

5. Впервые определены характерные особенности поведения функции контраста спекл-картин, по которым можно осуществлять мониторинг состояния хрящей в процессе умеренного ИК лазерного нагрева и определять такие специфические особенности, как начало денатурации коллагена.

6. Впервые изучены возможности регистрации динамики спекл-картин из скрытых для прямого наблюдения участков с помощью оптического жгута. Показано, что статистические характеристики спекл-картин, полученные с использованием оптического жгута, совпадают с соответствующими характеристиками, полученными без использования жгута.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:**

1. Kuznetsova L.V., Baranov S.A., Sviridov A.P., Zimnyakov D.A. Comparative analysis of two modalities for speckle contrast monitoring of tissue structure modification. // Proceedings of the SPIE, 2004, v.5475, pp.126-129.

2. Kuznetsova L.V., Zimnyakov D.A., Sviridov A.P., Baranov S.A., Ignatieva N.Yu. Dynamic laser speckles as applied to study of the laser-mediated structural changes of the collagenous biotissues. // Proceedings of the SPIE, 2006, v.6085, pp.56-63.

3. Zimnyakov D.A., Sviridov A.P., Kuznetsova L.V., Baranov S.A., Ignatieva N.Yu. Monitoring of tissue thermal modification with a bundle-based full-field speckle analyzer. // Applied Optics, v.45(18), pp.4480-4490.

4. Зимняков Д.А., Свиридов А.П., Кузнецова Л.В., Баранов С.А., Игнатъева Н.Ю., Лунин В.В. Кинетический анализ термических модификаций в биологических тканях методом спекл-интерферометрии. // Журнал физической химии, 2007, т.81(4), сс.626-631.

5. Баранов С.А., Свиридов А.П. Динамика спеклов при лазерном нагреве биологических тканей. // Сборник трудов, посвященный 70-летию академика Е.П. Велихова. М: Изд-во РНЦ "Курчатовский институт", 2006.