

# Структурные изменения в соединительных тканях при умеренном лазерном нагреве

В.Н.Баграташвили\*, Н.В.Баграташвили\*, Н.Ю.Игнатъева\*\*, В.В.Лунин\*\*, Т.Е.Гроховская\*\*, С.В.Аверкиев\*\*, А.П.Свиридов\*, Г.Ш.Шах\*

*Методами ИК спектроскопии (традиционной и комбинационного рассеяния) и дифференциальной сканирующей калориметрии исследованы изменения структуры жировой и фиброзной тканей после воздействия ИК лазерного излучения мощностью 2 и 3 Вт. Показано, что ИК лазерный нагрев до 50 °С образцов фиброзной ткани и до 75 °С – образцов жировой ткани вызывает изменение надмолекулярной структуры их белков и триацилглицеринов соответственно, не нарушая при этом внутримолекулярных связей. Нагрев до 70 °С (фибrousная ткань) и до 90–110 °С (жировая ткань) приводит к частично обратимой денатурации белков и окислению жиров.*

**Ключевые слова:** лазерная термопластика, соединительные ткани, денатурация коллагена, плавление триацилглицеринов.

## 1. Введение

Использование новых лазерных технологий в медицине стимулирует интенсивные исследования физико-химических процессов, вызванных действием лазерного излучения на биоткани [1]. Применяется воздействие на ткань лазерного излучения с умеренной мощностью, при котором не происходит необратимой химической деструкции макромолекул, составляющих каркас матрикса ткани, но достигается терапевтический или хирургический эффект (спайка сосудов [2], изменение формы хрящей носовой перегородки [3] и др.).

Измерение оптических характеристик биотканей в режиме реального времени позволяет оценивать изменения, появляющиеся в этих тканях при воздействии лазерного излучения [3–5]. Однако таких данных недостаточно для описания всех происходящих при этом физико-химических процессов. В то же время именно изменение надмолекулярной структуры биоткани приводит к изменению её биомеханических, реологических, оптических и других свойств.

Целью данной работы является исследование возможных изменений в химическом составе и структурной организации компонентов соединительной ткани при нагреве ИК лазерным излучением.

## 2. Материалы и методы

Исходными материалами служили фибrousная ткань (ФТ) и подкожный жир, выделенные из скуловой области шестимесячного поросенка, а также подкожный жир че-

ловека из области нижнего века и бедра. Материалы помещали в холодильник (4 °С) и использовали в течение пяти суток. Было показано, что исследуемые физико-химические свойства тканей в течение этого времени не изменялись. Фибrousную ткань последовательно отмывали в воде, выдерживали в ацетоне (4 °С, 12 ч) и диэтиловом эфире (20 °С, 4 ч). Это приводило к полной экстракции липидов.

Для обработки образцов использовалось излучение эрбиевого волоконного ИК лазера ЛС-1,56-5 («ИРЭ-Полус», Россия) с длиной волны  $\lambda = 1.56$  мкм. Облучение образцов фибrousной и жировой тканей проводилось в разных режимах. На образцы ФТ, закрепленные вертикально, излучение лазера подавалось с помощью световода. Мощность излучения составляла 2 и 3 Вт, интенсивность воздействия – 7 и 10 Вт/см<sup>2</sup> соответственно при диаметре облучаемой зоны 6 мм. Контроль температур осуществлялся дистанционным методом ИК радиометрии, сигнал ИК эмиссии собирался с площади 2.5 мм<sup>2</sup>. Температура образцов достигала 50 и 70 °С при мощности излучения 2 и 3 Вт соответственно.

При обработке образцов жировой ткани диаметр лазерного пятна варьировался от 3 до 7 мм путем изменения расстояния между торцом световода и поверхностью образца. Время лазерной обработки составляло от 30 до 270 с, мощность излучения – 3 и 3.5 Вт. Температура образцов измерялась с помощью игольчатой термопары диаметром 30 мкм.

Все спектральные характеристики исследуемых тканей были получены на фурье-спектрофотометре EQUINOX 55/S с приставкой для комбинационного рассеяния (КР). Для образцов жировой ткани, нанесенных на подложку из NaCl, регистрировались спектры поглощения с разрешением 0.5 см<sup>-1</sup>. Непрозрачные образцы ФТ высушивались над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, зажимались между двумя окнами из CaF<sub>2</sub> и исследовались методом спектроскопии КР. Спектр, возбуждаемый Nd:YAG-лазером (1.064 мкм, 0.2 Вт), записывался с разрешением 4 см<sup>-1</sup>, усреднялся по 150 сканам и подвергался обратному фурье-

\*Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Россия, 142190 Троицк, Московская обл., ул. Пионерская, 2; e-mail: bagrat@omega.laser.ru

\*\*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: nyu@kge.msu.ru

преобразованию. Каждый спектр был откалиброван по интенсивности C–H-колебаний ( $2932\text{ см}^{-1}$ ) и подвергнут процедуре фурье-сглаживания по 4 точкам.

Термическое поведение препаратов изучалось методом дифференциальной сканирующей калориметрии на стандартном приборе Mettler TA4000. Вес образцов составлял не более 15 мг, анализ проводился в герметичных алюминиевых боксах (объемом  $0.04\text{ см}^3$  каждый) при скорости нагрева  $10\text{ °C/мин}$  и скорости охлаждения  $5\text{ °C/мин}$ . Сигнал калибровался по теплоте плавления индия.

### 3. Результаты и обсуждение

#### 3.1. Фиброзная ткань

На рис.1 представлены спектры КР фиброзной ткани. Подобный вид спектров типичен для одной из разновидностей соединительной ткани – коллагеносодержащей ткани [6–8]. В спектре облученной ФТ в области C–H-колебаний не появляются новые полосы, что говорит об отсутствии глубокой химической деструкции ткани при используемых режимах воздействия. Облучение тканей приводит к уменьшению относительной интенсивности полосы Амид III, что свидетельствует об изменении надмолекулярной структуры белков.

На рис.2 приведены результаты калориметрических исследований образцов ФТ (весовое содержание воды составляет 70%). На термограммах контрольных образцов при некоторой температуре  $T_{m1} = 70\text{ °C}$  отчетливо проявляется пик, характеризующий эндотермический переход с тепловым эффектом  $Q_{m1}$ , равным  $46 \pm 2\text{ Дж}$  на 1 г сухого остатка биоткани. Температура  $T_{m1}$  и тепловой эффект  $Q_{m1}$  перехода соответствуют параметрам денатурации коллагена в образцах соединительных тканей с содержанием воды около 70% [9–11]. Лазерный нагрев ФТ до температуры  $50\text{ °C}$  не приводит к денатурации коллагена, и эндотермический эффект воспроизводится при последующих калориметрических исследованиях (кривая 2). Эти данные подтверждают сохранение структуры коллагенового волокна после лазерной обработки в те-

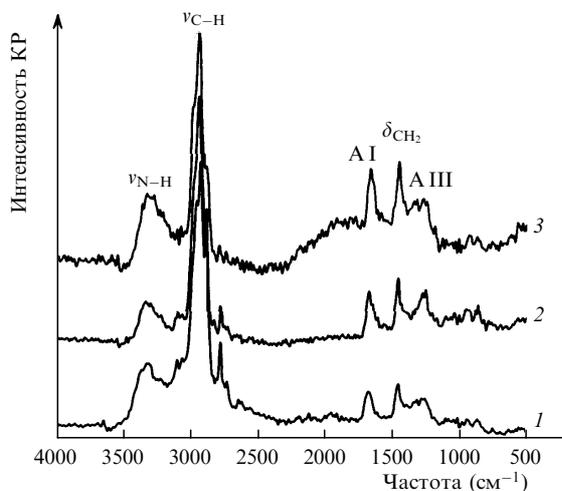


Рис.1. Спектры КР фиброзной ткани для контрольного (1) и облученных лазером мощностью 2 (2) и 3 Вт (3) образцов;  $\nu_{C-H}$ ,  $\nu_{N-H}$  – частоты валентных колебаний,  $\delta_{CH_2}$  – частота деформационных колебаний, AI и AIII – характеристические полосы колебаний пептидной группы.

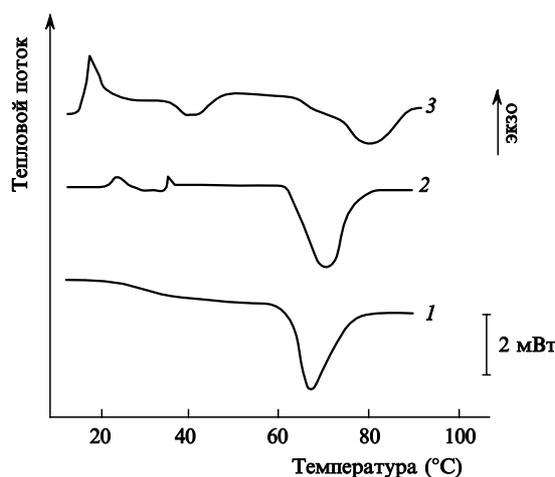


Рис.2. Термограмма фиброзной ткани для контрольного образца (1) и образцов, подвергнутых лазерному нагреву в течение 10 с до  $T_{max} = 50$  (2) и  $70\text{ °C}$  (3).

чение 10 с при мощности 2 Вт. После нагрева образцов до температуры  $70\text{ °C}$  и выше вид термограмм значительно изменяется (кривая 3). Эндотермический пик, соответствующий денатурации коллагена, либо исчезает, либо становится размытым, а величина  $Q_{m1}$  уменьшается в несколько раз. Это указывает на денатурацию коллагена при лазерной обработке в данном режиме.

На термограммах образцов проявляются еще два пика, соответствующие экзотермическому ( $T_r = 21\text{ °C}$ ,  $Q_r = 9.2\text{ Дж/г}$ ) и эндотермическому ( $T_{m2} = 42.5\text{ °C}$ ,  $Q_{m2} = 7.1\text{ Дж/г}$ ) переходам. Наблюдаемое термическое поведение образцов характерно для закаленных полимеров и связано с рекристаллизацией аморфного полимера при температуре, превышающей температуру стеклования, и с последующим плавлением кристаллических областей [12].

Подобно описанным эффектам, после ИК лазерного нагрева, приводящего к денатурации (разрушению структуры тройной спирали) макромолекул коллагена, следует быстрое охлаждение до температуры  $18\text{ °C}$ , когда сегментарная подвижность полипептидных цепей мала для укладки их в квазикристаллическую фибриллярную структуру. При последующем нагреве подвижность частей макромолекулы возрастает и вновь происходит образование структуры тройной спирали (микрофибриллы). Однако этот процесс протекает лишь частично ( $Q_{m2} < Q_{m1}$ ) и коллагеновое волокно не восстанавливается ( $T_{m2} < T_{m1}$ ).

Отметим, что плавление коллагена при  $40\text{ °C}$  наблюдалось и при повторном сканировании температуры через определенный промежуток времени (не менее 1 ч после первого нагрева) [11]. В то же время процесс рекристаллизации при повторном нагреве коллагена в литературе не описан. В связи с этим наблюдаемый в настоящей работе результат можно объяснить высокими скоростями нагрева-охлаждения при ИК лазерном воздействии. По-видимому, при быстром кратковременном нагреве полипептидные цепи макромолекул коллагена – основного компонента исследуемой ФТ – не успевают полностью разойтись и принять конформацию случайных клубков. Это облегчает повторную укладку цепей в тройную спираль при последующем нагреве после практически мгновенного охлаждения, приводящего к «замораживанию» подвижности цепей.

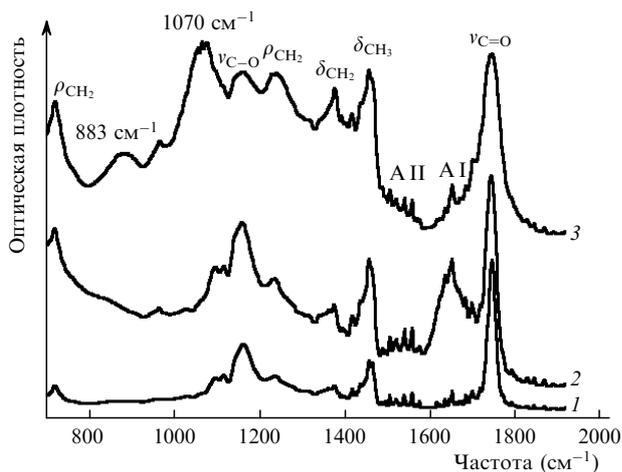


Рис.3. Спектры поглощения жировой ткани свиньи (1), а также жировой ткани человека для контрольного образца (вид спектра не менялся после лазерного нагрева до 75 °С в течение 2 мин) (2) и образца, подвергнутого лазерному нагреву до 90–110 °С в течение 1 мин (3);  $\rho_{\text{CH}_2}$  – частота крутильных колебаний (см. также обозначения на рис.1).

### 3.2. Жировая ткань

В спектрах поглощения жировой ткани человека и свиньи (рис.3) проявляются колебания, характерные для сложных эфиров, к которым относятся основные компоненты жировой ткани – триглицерины (ТГ) [13]. Интенсивность поглощения в области амидных полос невелика, что соответствует низкому содержанию белков. Спектры контрольных и нагретых лазерным излучением до температуры 75 °С образцов жировой ткани человека и свиньи оказались идентичными. Таким образом, заметных химических изменений состава жировых тканей при таком лазерном воздействии не наблюдается. Уменьшение относительной интенсивности полосы Амид I может быть связано с разрушением нативной конформации белков [8].

Более интенсивное ИК лазерное воздействие (время облучения 60 с, температура нагрева образца 100–130 °С) приводит к отчетливым изменениям в спектре КР образцов жировой ткани человека. Появляются полосы поглощения с максимумами на частотах 1070 и 883  $\text{cm}^{-1}$ , относящиеся к колебаниям эфирной группы и эпокси группы соответственно [13]. Уменьшается относительная интенсивность поглощения на частоте 3006  $\text{cm}^{-1}$ , соответствующей С–Н-колебаниям при двойной связи С=C. Можно полагать, что интенсивный лазерный нагрев открытых участков жировой ткани приводит к окислению двойной связи кислородом воздуха.

Табл.1. Изменение термических характеристик жировой ткани после лазерной обработки.

Жировая ткань	$\tau$ (с)	$T_{\text{max}}$ (°С)	$T_{\text{cr}}$ (°С)	Экзотермический переход		Эндотермический переход	
				$T_{\text{ph}}$ (°С)	$Q_{\text{ph}}$ (Дж/г)	$T_m$ (°С)	$Q_m$ (Дж/г)*
Человека	0	–	$-7.5 \pm 1.5$	–	–	$1.2 \pm 0.3$	$106 \pm 8$
	30	50	$-8.5 \pm 0.5$	$-20.3 \pm 0.2$	$3.2 \pm 0.5$	$-0.6 \pm 0.3$	$95 \pm 10$
	90	50	-10.9	-20.3	4.7	-1	100
	270	50	-14.2	-20.3	4.4	-1.8	86
	30	70	$-16 \pm 1$	$-20.3 \pm 0.1$	$4.8 \pm 1.2$	-3.5	$68 \pm 8$
Свиньи	–	–	$-2.2 \pm 0.8$	–	–	$29.4 \pm 0.5$	$95 \pm 10$
	30	70	-2.8	–	–	$30 \pm 0.5$	$93 \pm 10$

\*Теплота плавления ТГ в жировой ткани контрольных образцов соответствует теплоте плавления  $Q_m$  природных жиров [14, 15].

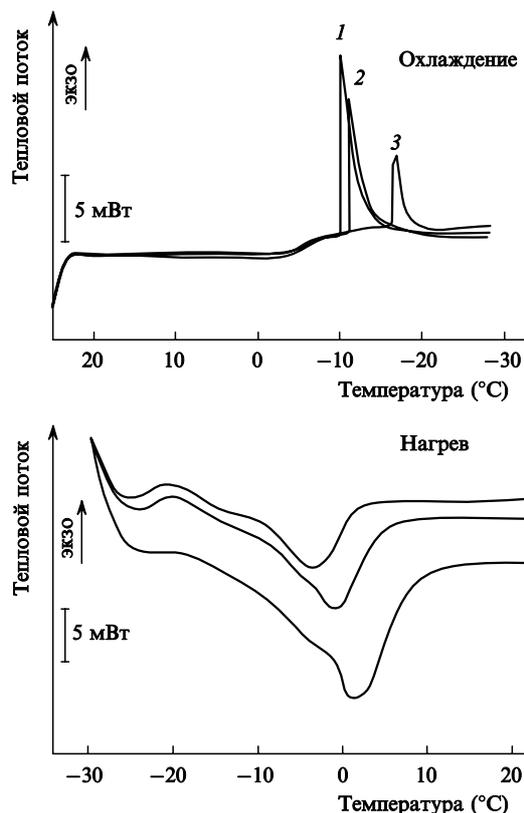


Рис.4. Термограммы жировой ткани человека для контрольного образца (1) и образцов, подвергнутых в течение 90 с лазерному нагреву до 50 (2) и 70 °С (3).

Исследование термических характеристик жировой ткани показало, что при увеличении максимальной температуры  $T_{\text{max}}$  и времени лазерной обработки  $\tau$  уменьшаются температура кристаллизации  $T_{\text{cr}}$  и температура последующего плавления  $T_m$ , а также теплота плавления  $Q_m$  (табл.1). Кроме того, перед плавлением облученных образцов наблюдается экзотермический переход с тепловым эффектом  $Q_{\text{ph}}$  при температуре  $T_{\text{ph}}$  (рис.4). Для жировой ткани свиньи, плавящейся до 45 °С, подобное явление не обнаружено.

Очевидно, что различие в термическом поведении жировой ткани человека и свиньи связано с различным составом ТГ. Увеличение доли остатков жирных непредельных кислот в ТГ приводит к уменьшению температуры плавления жировой ткани человека [14, 15]. Лазерный нагрев обеспечивает существенное превышение температуры жировой ткани человека над её температурой плавления.

Известно, что в расплавах жиров сохраняются элементы упорядоченной структуры (молекулярные ассоциаты), служащие центрами кристаллизации при последующем охлаждении расплава. Лазерная обработка жировой ткани человека до 50–70 °С приводит к значительному перегреву расплава ТГ и, как следствие, к уменьшению размеров и разрушению групп молекулярных ассоциатов. Заметное понижение  $T_{сг}$ ,  $T_m$  и  $Q_m$  с увеличением  $\tau$  и  $T_{max}$  свидетельствует об уменьшении стабильности кристаллической фазы, полученной при охлаждении жировой ткани, подвергнутой лазерной обработке, что связано с увеличением доли ТГ, остающихся в жидком состоянии при переохлаждении. Есть мнение [14–16], что при быстром охлаждении перегретой жировой ткани человека образуется метастабильная гексагональная кристаллическая модификация ТГ. При последующем нагреве гексагональная модификация переходит в более устойчивую орторомбическую. Экзотермический эффект, соответствующий этому переходу, отчетливо проявляется на термограммах облученных образцов, после чего следует плавление кристаллической фазы.

Быстрый и локальный лазерный нагрев жировой ткани свиньи до 70 °С не приводит к разрушению молекулярных ассоциатов, о чем свидетельствует идентичное термическое поведение облученных и исходных образцов.

Эндотермический процесс, связанный с денатурацией белков, наблюдается на термограммах образцов жировой ткани человека и свиньи. Температура пика денатурации составляет соответственно 69.3 и 66.9 °С. Тепловой эффект процесса денатурации белков уменьшается после лазерной обработки исходной жировой ткани. Таким образом, лазерный нагрев жировой ткани приводит к денатурации белков.

#### 4. Заключение

Умеренный лазерный нагрев, не затрагивая внутримолекулярных связей компонентов жировой и фиброзной тканей, приводит к значительной перестройке их над-

молекулярной структуры. При этом в жировой ткани человека может наблюдаться разрушение молекулярных ассоциатов ТГ и денатурация белков. Увеличение мощности лазерного излучения ведет к перегреву ткани и стимуляции термохимических процессов, затрагивающих и молекулярную структуру. В ФТ происходит плавление коллагенового волокна, если температура, достигаемая при лазерном облучении, превышает 70 °С. Однако структура тройной спирали макромолекул коллагена может частично восстанавливаться.

Авторы благодарят РФФИ (грант № 99-02-16855 и грант поддержки ведущих научных школ № 00-15-96596).

1. Müller G., Roggan A. *Laser induced interstitial thermotherapy* (Washington: Bellingham, 1995).
2. Chapman R. *Lasers Surg. Med.*, **22**, 171 (1998).
3. Sobol E., Sviridov A., Omelchenko A., Bagratashvili V. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, **17**, 553 (2000).
4. Sobol E., Sviridov A., Kitai M., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3601**, 122 (1999).
5. Баграташвили В.Н., Баграташвили Н.В., Гапонцев В.П., Махмутова Г.Ш., Минаев В.П., Омельченко А.И., Самарцев И.Э., Свиридов А.П., Соболев Э.Н., Цыпина С.И. *Квантовая электроника*, **31**, 534 (2001).
6. Manoharan R., Wang Y., Feld M.S. *Spectrochimica Acta, Part A*, **52**, 215 (1996).
7. Renugopalakrishnan V., Carreira L.A., Collette T.V. *Zs. Naturforsch.*, **53**, 383 (1998).
8. Goheen S.C., Lis L.J., Kauffman J.W. *Biophys. Biochem. Acta*, **536**, 197 (1978).
9. Miles Ch.A., Ghelashvili M.J. *Biophys. J.*, **76**, 3243 (1999).
10. Luescher M., Rüegg M., Schindler P. *Biopolymers*, **13**, 2480 (1974).
11. Kopp J., Bonnet M., Renou J.P. *Matrix*, **9**, 443 (1989).
12. Манделькерн Л. *Кристаллизация полимеров* (М.-Л.: Химия, 1966).
13. Свердлов Л.М., Ковнер М.А., Крайнов Е.П. *Колесательные спектры многоатомных молекул* (М.: Наука, 1970).
14. *Химия жиров*. Под ред. Б.Н.Тютюнникова (М.: Колос, 1992).
15. Garti N., Sato K. *Cristalization and polimorphism of fats and fatty acids* (New York: Marcel Dekker, 1988).
16. Parks J.S., Atkinson D., Small D.M., Rudel L.L. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12992 (1981).