

Анализ лазерно-индуцированной модификации коллагенового каркаса с помощью нелинейной оптической микроскопии

О.Л.Захаркина, Е.А.Сергеева, М.Ю.Кириллин, Н.Ю.Игнатъева

Рассмотрено использование нелинейной оптической микроскопии в режиме ГВГ для оценки изменения структуры коллагенового каркаса ткани связки после ИК лазерного нагрева до температуры 60 °С. Предденатурационная модификация матрикса ткани носила специфический характер и заключалась в изменении укладки групп волокон, направленных одноосно в интактной ткани. Исследован двумерный фурье-спектр полученных ГВГ-изображений, по которому был определен индекс ориентации коллагена. С увеличением мощности ИК лазерного излучения от 0.3 до 2 Вт выраженность лазерно-индуцированной дезорганизации сопровождалась уменьшением индекса ориентации коллагена. Полученные результаты позволяют предположить, что специфическая дезорганизация коллагенового каркаса ткани обусловлена значительной скоростью и локализацией (локальностью) лазерного нагрева, что приводит к механическим искажениям структурных элементов матрикса ткани.

Ключевые слова: лазерный нагрев, дезорганизация коллагенового каркаса, нелинейная оптическая микроскопия, преобразование Фурье.

1. Введение

Лазерное воздействие умеренной интенсивности находит все большее применение в субабляционных процедурах при термотерапии соединительных тканей [1, 2]. Это стимулирует исследователей к экспериментальному изучению превращения коллагена, который является основным структурным белком соединительной ткани, при лазерном нагреве. Хорошо известно, что при нагревании коллагенсодержащего материала до критической температуры (обычно свыше 60 °С) структура молекул коллагена изменяется от конформации тройной спирали до случайного клубка. В результате этого перехода высокоорганизованная квазикристаллическая структура трансформируется в аморфную [3]. Полный процесс преобразования называется денатурацией коллагена. Поскольку первичный эффект ИК лазерного воздействия умеренной интенсивности обусловлен превращением поглощенной энергии излучения в тепло, то и непосредственный отклик коллагенового каркаса соединительной ткани на такое облучение обычно ограничивается обсуждением возможности термической денатурации коллагена [1, 2].

В недавних работах продемонстрированы различия в поведении коллагенового каркаса при лазерном и традиционном нагревах [4–8]. Установлено, в частности, что лазерно-индуцированная дезорганизация волокнистой

структуры коллагена имеет специфический характер [6–8]. Наиболее информативные изображения модифицированных коллагенсодержащих образцов были получены с помощью нелинейной оптической микроскопии в режиме регистрации сигнала ГВГ [3, 6, 8]. Действительно, ГВГ-микроскопия успешно применяется для анализа изменений архитектуры соединительных тканей, ориентационно упорядоченных на всех иерархических уровнях (от нецентросимметричных молекул коллагена до пучков) [3, 9, 10]. Подходы к количественному анализу ГВГ-изображений коллагеновых структур соединительных тканей подробно описаны в обзоре [9]. Среди этих подходов особое место занимает быстрое преобразование Фурье (БПФ), которое позволяет получить количественную характеристику организации структурных элементов двумерного изображения, содержащего, например, набор сонаправленных волокон. Сечение двумерного спектра мощности получаемого при БПФ исходного ГВГ-изображения имеет форму эллипса, вытянутого в направлении, ортогональном направлению волокон на изображении. В качестве численной оценки степени ориентации структур волокна удобно использовать либо отношение короткой оси эллипса к длинной (Aspect Ratio, AR) [8, 9], либо индекс ориентации коллагена $N = 1 - AR$ [11], который для идеально изотропной ткани равен нулю.

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении особенностей лазерно-индуцированной предденатурационной модификации коллагенового каркаса. В качестве объекта исследований была выбрана связка надколенника (Patellar ligament), которая является подходящей моделью для выявления тонких эффектов изменения коллагена при различных воздействиях. Матрикс этой ткани высокоупорядочен – все волокнистые структуры, от макромолекул до пучков, ориентированы параллельно длинной оси связки [12]. Ткань подвергали лазерному и гидротермальному нагреву до температуры 60 °С, что ниже предела денатурации [6]. Для оценки количества интакт-

О.Л.Захаркина. Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Россия, 108840 Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2

Е.А.Сергеева, М.Ю.Кириллин. Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н. Новгород, ул. Ульянова, 46; e-mail: mkirillin@yandex.ru

Н.Ю.Игнатъева. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы, 1, стр. 3; e-mail: nyu@kge.msu.ru

Поступила в редакцию 27 ноября 2019 г.

ных трехспиральных молекул мы использовали дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) [13]. Изменения в организации коллагенового каркаса оценивали на основе формируемых методом ГВГ-микроскопии изображений интактных и прогретых образцов ткани. По этим изображениям с помощью БПФ-анализа определяли степень упорядоченности коллагена.

2. Материалы и методы

Связки надколенника были получены от половозрелых кроликов не позднее чем через 5 ч post mortem. Их механически отделяли от прилежащих тканей, хранили в растворе NaCl (0.15 М) при 4°C и использовали в эксперименте в течение 36 ч.

2.1. Лазерная и гидротермальная обработки

Для проведения лазерно-индуцированной модификации коллагенового каркаса использовали ИК лазер на кварцевом волокне, активированном эрбием ЛС-1.56-5 («ИРЭ-Полус», Россия), который излучал в непрерывном режиме на $\lambda = 1.56$ мкм с максимальной мощностью 5 Вт. Длительность излучения в диапазоне 0.01 – 10 с может задаваться автоматически с помощью источника питания лазера. Излучение лазера доставляли дистанционно через кварцевое оптическое волокно с диаметром сердцевины 600 мкм (числовая апертура 0.22), ориентированное перпендикулярно поверхности образца. Расстояние между торцом волокна и облучаемой поверхностью составляло 5 мм, при этом диаметр облучаемой зоны равнялся 1.6 ± 0.1 мм. Для лазерного воздействия использовались излучения с мощностями 0.3, 0.5, 1 и 2 Вт, соответствующими режимам Л1–Л4.

Длительность облучения для достижения целевой температуры 60°C при выбранной мощности определяли в отдельном эксперименте. Для этого динамику температурных полей на поверхности ткани регистрировали с помощью тепловизора FLIRA655*sc (FLIR Systems Inc., США) с частотой кадров до 200 Гц и объектива FOL25. Обработку термограмм проводили посредством программного обеспечения FLIR Research IR Max.

При лазерно-индуцированной модификации коллагенового каркаса для каждой выбранной мощности лазерного излучения (режимы Л1–Л4) регистрировалась динамика температурного поля на поверхности ткани.

Гидротермальную обработку образцов проводили в термостате, заполненном раствором NaCl (0.15 М) при температурах 60 и 85°C (режимы Т1 и Т2 соответственно) в течение 2 мин. Предварительный эксперимент с применением игольчатой термопары показал, что за 1.5 мин температура внутри прогреваемого образца достигала температуры термостата.

В итоге было получено и исследовано семь групп образцов (табл.1): интактная ткань, ткань после лазерной обработки (Л1–Л4) и ткань после гидротермальной обработки (Т1, Т2).

2.2. Анализ трансформации коллагенового каркаса

Лазерное облучение связки проводили на пяти разных локализациях зоны облучения для каждого режима воздействия. После каждой обработки облученную зону с характерными размерами 1.6×1.6 мм толщиной ~ 1 мм

Табл.1. Изменение индекса ориентации коллагена N в ткани связки после различных воздействий.

Режим	Воздействие	Параметры воздействия	N
Интактный	–	–	0.58 ± 0.01
Л1	ИК лазер	0.3 Вт, 15 с	$0.52 \pm 0.01^{*,**}$
Л2	ИК лазер	0.5 Вт, 4 с	$0.54 \pm 0.01^{*,**}$
Л3	ИК лазер	1 Вт, 1 с	$0.38 \pm 0.01^{*,***}$
Л4	ИК лазер	2 Вт, 0.4 с	$0.34 \pm 0.01^{*,***}$
Т1	Гидротермальное	60°C, 120 с	$0.48 \pm 0.01^*$
Т2	Гидротермальное	85°C, 120 с	$0.15 \pm 0.01^*$

* Статистически значимо отличаются от интактных образцов; **, *** статистически значимо не отличаются.

вырезали для анализа. Два из пяти образцов подвергали термическому анализу непосредственно после воздействия, три образца помещали в 4%-ный нейтральный раствор формальдегида для дальнейшего оптического исследования. Гидротермальной обработке подвергали три образца связки, один из которых предназначался для термического анализа, два – для оптических исследований.

Термический анализ образцов проводили на сканирующем дифференциальном калориметре Phoenix DSC 204 (Netzsch, Германия) в закрытых герметичных боксах в диапазоне температур 20–90°C со скоростью нагрева 10К/мин. В случае интактных образцов на ДСК-термограммах в диапазоне температур 62–76°C появлялся пик с максимумом при 67.0 ± 0.5 °C, обусловленный денатурацией коллагена. Площадь пика соответствовала энтальпии денатурации коллагена: $\Delta H_d = 63 \pm 3$ Дж/г. Для образцов, подвергнутых обработке, наличие пика свидетельствует о сохранении макромолекулами коллагена структуры тройной спирали, а исчезновение пика доказывает полную денатурацию макромолекул в результате обработки.

ГВГ-визуализацию образцов проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение нелинейного отклика осуществлялось излучением импульсного фемтосекундного титан : сапфирового лазера MaiTai HP (Spectra Physics, США) на длине волны 800 нм с длительностью импульсов 100 фс и частотой их следования 80 МГц. Средняя мощность излучения ИК лазера находилась в пределах 7 мВт. Это соответствовало пиковой интенсивности в фокальной области около 0.1 ТВт/см², что в несколько раз меньше характерной интенсивности импульсного фемтосекундного излучения, вызывающей повреждения клеток [14]. Сигнал ГВГ выделяли с помощью дихроичного фильтра видимого излучения КР650 (Carl Zeiss) и узкополосного фильтра ($\lambda = 400$ нм, $\Delta\lambda = 10$ нм). Для визуализации препараты ткани нарезали вдоль волокон, и срезы толщиной ~ 500 мкм помещали между покровными стеклами. ГВГ-изображение среза, содержащее 1024×1024 пикселя, формировали с помощью объектива 1.3 Oil DIC M27 EC-Plan- Neofluar (Carl Zeiss) с увеличением 40, поле зрения изображения составляло 225×225 мкм. Для улучшения отношения сигнал/шум каждую линию изображения усредняли по восьми сканам.

Обработку ГВГ-изображений методом двумерного БПФ осуществляли с помощью программного обеспечения, разработанного в среде MATLAB [15]. Первичное ГВГ-изображение делилось на 16 квадратов. Для каждого квадра-

та выполняли БПФ и для полученного двумерного спектра яркости ГВГ-изображения рассчитывали величину AR и индекс $N = 1 - AR$. Среднее значение параметров AR и N получали на основе анализа пяти первичных ГВГ-изображений. Для сравнения средних значений двух независимых выборок применяли t -критерий Стьюдента с уровнем значимости 0.05.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.1 представлены примеры динамики температуры в центре лазерного пятна при мощностях излучения 0.5 и 1 Вт. Времена достижения целевой температуры 60 °С были определены на основе таких температурных зависимостей для всех мощностей и приведены в табл.1.

На рис.2 представлены ГВГ-изображения интактной ткани связки. На изображениях четко идентифицируются параллельные волокна коллагена, уложенные в пучок. Такая упорядоченная организация коллагена характеризуется достаточно большим индексом ориентации коллагена: $N = 0.58 \pm 0.01$. Отметим, что это значение близко к $N = 0.59 \pm 0.08$, полученному для нормальной дермы в [11, 16], причем авторы этих работ проводили БПФ-анализ ГВГ-изображений с размерами 60×60 мкм, на которых представлена часть лишь одного пучка коллагена с параллельно уложенными волокнами. Для ткани роговицы с коллагеновыми фибриллами, организованными в ламеллы, $N \leq 0.4$ из-за волнообразного хода групп фибрилл [8]. Волокна коллагена в отдельных местах ткани связки образуют характерные для нее волнообразные складчатости – кримпы – с периодом от 70–120 мкм. На разных ГВГ-изображениях количество и протяженность кримпов могут быть разными, однако средние по кадру значения индекса ориентации коллагена остаются близкими. Например, для визуально различающихся изображений, представленных на рис 2, *a* и *б*, $N = 0.59 \pm 0.01$ и 0.57 ± 0.01 соответственно. Мы полагаем, это обусловлено тем, что усредненное значение N рассчитывается на меньших масштабах – в квадратах размером 256×256 пикселей, в пределах которых коллагеновые волокна остаются уложенными параллельно.

Термический анализ образцов после тепловой обработки при 85 °С показал, что все молекулы претерпели переход спираль – клубок. Сигнал ГВГ в данных образцах критически падал, волокнистая структура на ГВГ-изобра-

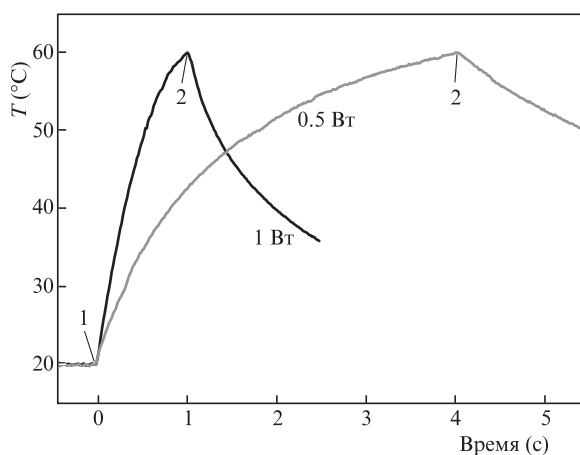


Рис.1. Динамика температуры в центре лазерного пятна при мощностях излучения 0.5 и 1 Вт: 1 – начало облучения, 2 – его окончание.

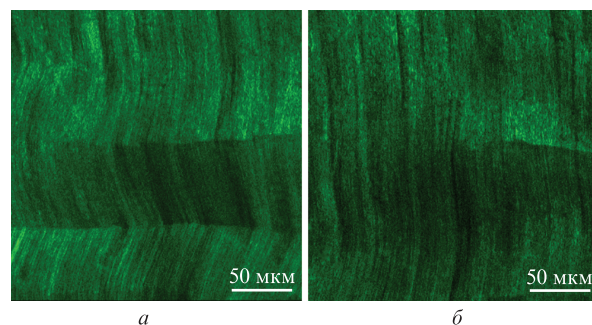


Рис.2. ГВГ-изображения ткани интактной связки при $N = 0.59 \pm 0.01$ (*a*) и 0.57 ± 0.01 (*б*).

жениях исчезала, ткань становилась изотропной (рис.3, *a*). Индекс ориентации коллагена N максимально приблизился к нулю и составил 0.15 ± 0.01 , что практически совпадает с аналогичным значением для аморфизированной ткани роговицы [8].

После нагрева ткани до 60 °С как с помощью излучения, так и в гидротермальных условиях, макромолекулы коллагена, по данным термического анализа, оставались интактными. На ГВГ-изображениях волокна коллагена визуализировались, хотя их взаимное расположение изменилось по сравнению с интактной связкой. На рис.4 представлены ГВГ-изображения центральных областей лазерного воздействия в режимах Л1–Л4. Пример ГВГ-изображения связки, подвергнутой гидротермальной обработке приведен на рис.3, *б*. Рассчитанные значения N даны в табл.1.

Дезорганизация коллагеновой сетки связки после лазерного воздействия имела специфический характер. При сохранении волокон как структурных единиц пучок волокон разделялся на группы. Эти группы расходились и пересекались, изменяя направление хода справа налево и сверху вниз. По мере увеличения мощности лазерного излучения индекс ориентации коллагена снижался (см. табл.1), однако его значение осталось больше 0.3, что подтвердило сохранение преимущественной ориентации волокон. Полученные данные коррелируют с результатами работы [8], где представлены и проанализированы ГВГ-изображения роговицы, подвергнутой ИК лазерному нагреву до температур ~50 и 60 °С. Авторы [8] показали, что дезорганизация фибриллярных структур коллагена роговицы сводится к тому, что по мере увеличения температуры ход групп фибрилл становится все более разнонаправленным и значение N уменьшается.

Искажение коллагеновой сетки после гидротермального прогрева носило иной характер. Волокна в целом продолжали быть параллельными друг другу, но заметно

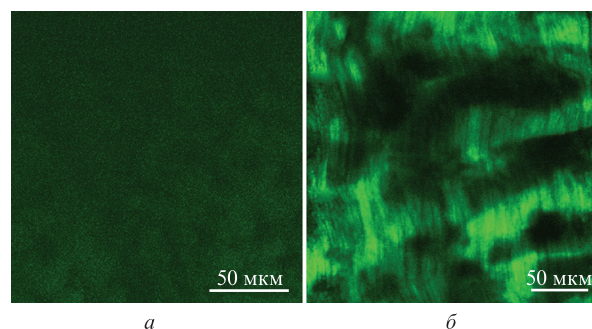


Рис.3. ГВГ-изображения ткани связки после гидротермального нагрева до 85 °С (*a*) и 60 °С (*б*).

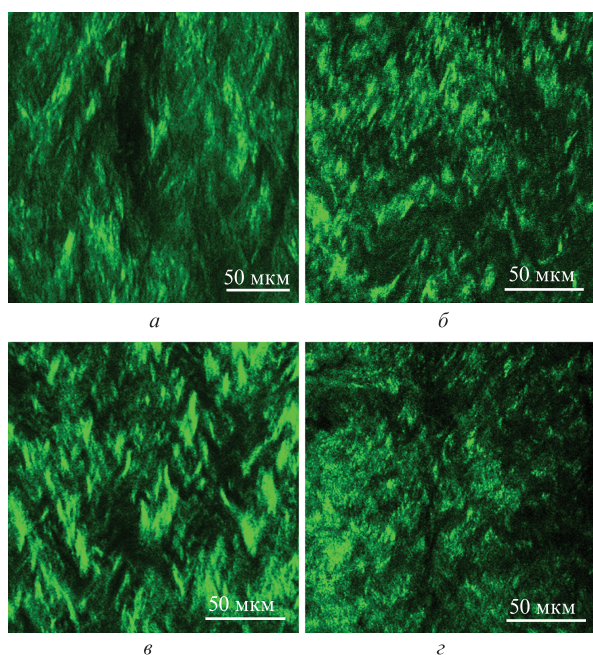


Рис.4. ГВГ-изображения ткани в центрах областей лазерного воздействия в режимах Л1 (а), Л2 (б), Л3 (в) и Л4 (з).

увеличилась складчатость структуры, т.е. ход всех волокон в пучке менялся одновременно (рис.3,б). Такое изменение ориентации привело к уменьшению N до 0.48 ± 0.01 . Интересно, что авторы [3] отмечали плавные искажения и увеличение волнообразного характера хода групп фибрилл коллагена при гидротермальном нагреве роговицы.

В отличие от квазиравновесного гидротермального нагрева, лазерный нагрев является неоднородным в пространстве и нестационарным во времени [1, 2]. Неравновесный нагрев инициирует потоки не только тепла, но и вещества, включая поток интерстициальной жидкости из зоны воздействия. Возможно, совокупность неоднородного нагрева пучка параллельных волокон, потока воды и сопротивления этому потоку плотной упаковки коллагена в ткани приводит к локальным напряжениям в пучке волокон и, как следствие, к деформации и смещениям групп волокон в разных направлениях. Такой эффект лазерного нагрева можно назвать фототермомеханическим. Интенсивность протекания процесса зависит от градиента температуры и динамики нагрева, которые, в свою очередь, определяются мощностью излучения. В зависимости от значений N можно выделить две группы режимов: Л1, Л2 и Л3, Л4. В каждой группе значения N близки, однако различие между группами оказалось значительным. Мы связываем это с изменением динамики нагрева при мощностях 0.3–0.5 Вт (Л1, Л2) и 1–2 Вт (Л3, Л4). Время нагрева до целевой температуры было существенно больше при меньших мощностях, однако зависимость этого времени от мощности не является линейной (см. табл.1). Это обусловлено релаксацией тепла при лазерном нагреве. Характерное время термической релаксации $\tau_{rel} = L^2/4\kappa$, где L – линейный размер нагретой зоны; $\kappa \sim 1.4 \times 10^{-7} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ – коэффициент температуропроводности [1, 2]. В рассматриваемых экспериментальных условиях (радиус нагретой зоны 1.5 мм, характерная глубина проникновения излучения ($\lambda = 1.56 \text{ мкм}$) $\sim 0.8 \text{ мм}$ [4]), релаксация протекает за времена от $\sim 4 \text{ с}$ (в радиальном направлении) до $\sim 1 \text{ с}$ (в глубь ткани). Мы полагаем, что наиболее значительные изменения, обусловленные фото-

термомеханическим эффектом, происходят за времена не более 1 с. Для режимов Л1, Л2 длительность лазерного воздействия превышает τ_{rel} , в системе устанавливается температурное поле, близкое к стационарному (см. рис.1). Температурный градиент за время, превышающее 1 с, оказывается не столь значительным, в результате влияние неравновесных эффектов уменьшается. В режимах Л3, Л4 время воздействия меньше времени термической релаксации, быстрее достигается большое различие температур в центре пятна и на границе зоны воздействия, отклонение от равновесия увеличивается и фототермомеханический эффект более выражен, что приводит к более существенным изменениям. Таким образом, уменьшение индекса ориентации коллагена по мере увеличения мощности излучения является объективной характеристикой эффективности лазерного воздействия и количественно соответствует степени искажения коллагенового каркаса ткани и степени отклонения процесса от равновесного.

Искажение укладки коллагена в условиях традиционного гидротермального нагрева сводится к увеличению складчатости в пределах пучка волокон, что также приводит к уменьшению индекса ориентации коллагена. Тем не менее представляется некорректным использовать значения N как единственную характеристику укладки коллагеновых волокон при сравнении разных способов воздействия, приводящих к специфической дезорганизации коллагенового каркаса ткани.

4. Заключение

В работе исследован характер деформаций коллагенового каркаса соединительной ткани, возникающих при лазерном нагреве. В результате лазерного нагрева упорядоченная одноосная упаковка фибрилл, волокон и пучков коллагена в ткани связки трансформировалась в отдельные и диспергированные группы взаимосвязанных волокнистых структур, сохранивших при этом общее направление хода волокон. Степень лазерно-индуцированной дезорганизации отражается в уменьшении индекса ориентации коллагена N , полученного методом двумерного БПФ на основе анализа ГВГ-изображений. Вероятно, что специфическая дезорганизация коллагенового каркаса ткани при лазерном нагреве обусловлена его скоростью и локализацией в малом объеме, т.е. неравновесным характером нагрева, что приводит к механическим искажениям структурных элементов матрикса ткани. Таким образом, при разработке и оптимизации характеристик лазерного воздействия на коллагенсодержащие ткани для достижения целевого эффекта необходимо учитывать особенности лазерно-индуцированных изменений матрикса. Помимо того, нельзя отождествлять результаты гидротермального и лазерного нагревов при моделировании клинической процедуры с использованием лазерного излучения вследствие существенно различающегося характера трансформации коллагенового каркаса.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части «Лазерная и гидротермальная обработка» и Государственному заданию ИПФ РАН (проект №0035-2019-0014) в части «Лазерная сканирующая микроскопия и численная обработка», а также РФФИ (грант №19-02-00135) в части «Анализ трансформации коллагенового каркаса».

1. Welch A.J., van Gemert M.J.C. *Optical-thermal Response of Laser-irradiated Tissue* (Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2011).
2. Niemz M.H. *Laser-tissue Interactions Fundamentals and Applications*, (Berlin: Springer 2004).
3. Matteini P., Cicchi R., Ratto F., Kapsokalyvas D., Rossi F., de Angelis M., Pavone F.S., Pini R. *Biophys. J.*, **103**, 1179 (2012).
4. Ignatieva N.Y., Zakharkina O.L., Andreeva I.V., Sobol E.N., Kamensky V.A., Myakov A.V., Averkiev S.V., Lunin V.V. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 675 (2007).
5. Игнатъева Н.Ю., Захаркина О.Л., Дадашева А.Р., Садекова А.Р., Баграташвили В.Н., Лунин В.В. *Журн. физ. химии*, **92**, 573 (2018).
6. Ignatieva N.Yu., Guller A.E., Zakharkina O.L., Sandnes B., Shekhter A.B., Kamensky V.A., Zvyagin A.V. *Lasers Med. Sci.*, **26**, 401 (2011).
7. Matteini P., Sbrana F., Tiribilli B., Pini R. *Lasers Med. Sci.*, **24**, 667 (2009).
8. Matteini P., Ratto F., Rossi F., Cicchi R., Stringari C., Kapsokalyvas D., Pavone F.S., Pini R. *Opt. Express*, **17**, 4868 (2009).
9. Cicchi R., Vogler N., Kapsokalyvas D., Dietzek B., Popp J., Pavone F.S. *J. Biophoton.*, **6**, 129 (2013).
10. Sun Y., Chen W.L., Lin S.J., Jee S.H., Chen Y.F., Lin L.C., So P.T., Dong C.Y. *Biophys. J.*, **91**, 2620 (2006).
11. Wu S., Li H., Yang H., Zhang X., Li Z., Xu S. *J. Biomed. Opt.*, **16**, 040502 (2011).
12. Kastelic J., Galeski A., Baer E. *Connect. Tissue Res.*, **6**, 11 (1978).
13. McClain P.E., Wiley E.R. *J. Biol. Chem.*, **247**, 692 (1972).
14. Vogel A., Noack J., Hüttman G., Paltauf G., in *Laser Ablation and its Applications* (Boston, MA: Springer, 2007, vol. 129, pp 231–280).
15. Сергеева Е.А., Кириллин М.Ю., Дуденкова В.В., Павлов М.В., Орлинская Н.Ю., Шахова Н.М. *СТМ*, **11** (3), 99 (2018).
16. Cicchi R., Kapsokalyvas D., De Giorgi V., Maio V., Van Wiechen A., Massi D., Lotti T., Pavone F.S. *J. Biophoton.*, **3**, 34 (2010).