

## ФОТОВОЗДЕЙСТВИЕ НА КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

© В. А. Дубровский,<sup>1</sup> Б. А. Дворкин,<sup>1</sup> И. Ю. Янина,<sup>2</sup> В. В. Тучин<sup>2, 3</sup><sup>1</sup> Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского,<sup>2</sup> Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевскогои <sup>3</sup> Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов;  
электронный адрес: mbf@sgmtu.ru

Экспериментально исследован эффект изменения оптических свойств клеток жировой ткани человека *in vitro* после фотодинамического воздействия. Исследование кинетики процесса проведено на основе цифровой микроскопии тонких слоев ткани. Статистическая компьютерная обработка полученных микроизображений позволила количественно оценить кинетику фотодинамического последствия на биоткань. Оптическая интерпретация изображений указывает на то, что наблюдаемое явление соответствует частичному лизису клеток жировой ткани без полной их деструкции.

Ключевые слова: фотодинамическое действие, клетки жировой ткани, статистическая обработка цифровых изображений.

Принятые сокращения: БЗ — бриллиантовый зеленый, пкс — пиксель,  $D$  — оптическая плотность,  $D_{cp}$  — усредненное по площади зоны значение  $D$ ,  $\sigma(D)$  — стандартное отклонение  $D$  от  $D_{cp}$ ,  $n_m$  — показатель преломления подкожной жировой ткани человека,  $n_m$  — показатель преломления межклеточной жидкости.

Настоящая работа относится к одному из важных направлений фотобиологии животной клетки — фотобиологическому действию света на клетки, сенсibilизированные экзогенными красителями (Красновский, 2004; Владимиров, Потапенко, 2006; Тучин, 2010; Wilson, 2010). Существует множество фотобиологических эффектов, многие из которых успешно используются в фототерапии с использованием как ламповых источников, так и лазеров, достаточно назвать широко применяемые на практике ПУФА-терапии псориаза при использовании фурукумарин (псорален) в качестве фотосенсибилизаторов и ультрафиолетовый свет А-диапазона (УФА) в качестве источника фотонов соответствующей энергии (Владимиров, Потапенко, 2006). В основе другой, не менее известной и интенсивно развивающейся в последние годы фототерапии, лежат фотобиологические эффекты, для осуществления которых требуется участие как минимум трех составляющих — света, кислорода и красителя, которые принято относить к фотодинамическим эффектам, а соответствующие красители называть фотодинамическими сенсибилизаторами (Владимиров, Потапенко, 2006). Главное достоинство фотодинамической терапии, которая уже используется и является перспективной при лечении как онкологических, так и воспалительных заболеваний, а также для дезактивации бактериальной микрофлоры и вирусов, является возможность использования света умеренной плотности мощности в видимом и ближнем инфракрасных диапазонах, вплоть до 800 нм, что дает возможность облучать значительные объемы патологической ткани (Тучин, 2010). Определенную роль в световом воздействии на фотосенсибилизиро-

ванные клетки могут оказывать и токсичные фотопродукты фотохимических реакций, происходящих под действием света в самих красителях (Владимиров, Потапенко, 2006; Engel et al., 2008).

В настоящей работе проведены экспериментальные исследования светового излучения видимого диапазона на клетки фотосенсибилизированной жировой ткани человека *in vitro*. Исследованию влияния света на жировую ткань посвящено немало работ. Так, рядом авторов (Игнатьева и др., 2001; Tsai et al., 2001; Solarte et al., 2003; Lukac et al., 2009; Fatemi, 2010; Tuchin et al., 2010) рассматривается неспецифическое тепловое воздействие лазерного излучения на жировую ткань, возможно сопровождаемое фотодинамическим эффектом за счет эндогенных или экзогенных хромофоров. Фотодинамические процессы часто привлекают к объяснениям фотобиологических эффектов, возникающих при облучении биообъектов слабыми световыми потоками видимого диапазона, часто используемыми в низкоинтенсивной лазерной (световой) терапии, например при лечении трофических язв и длительно незаживающих ран (Толстых и др., 2002; Karu, 2003; Huang et al., 2010). Эти процессы являются основой фотодинамической терапии рака (Меерович и др., 2000; Красновский, 2004; Странадко и др., 2006; Hamblin, Mroz, 2008; Тучин, 2010; Wilson, 2010), а также могут сопровождать селективный фототермолиз раковых опухолей при использовании индоцианина зеленого как фотосенсибилизатора при облучении диодным лазером с длиной волны 808 нм (Chen et al., 1995, 2010; Fickweiler et al., 1997). Различные аспекты фотОВОЗДЕЙСТВИЯ на клетки жировой ткани человека рассмотрены в ряде работ (Altshuler

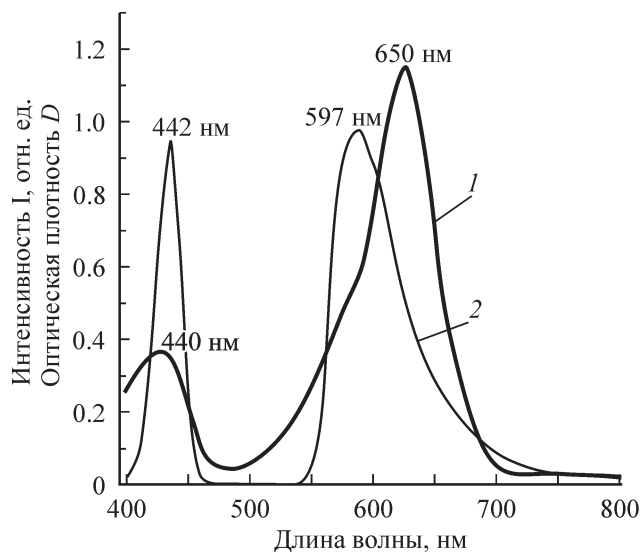


Рис. 1. Спектр поглощения бриллиантового зеленого (БЗ) (1) и спектр излучения диодной лампы Ultra Lume Led 5 (2).

$D$  — оптическая плотность красителя,  $I$  — интенсивность излучения лампы в относительных единицах.

et al., 2001; Belikov et al., 2003; Kim, Geronemus, 2006; Черкасова и др., 2007; Wanner et al., 2009). Вопросам световой деструкции жировой ткани, в том числе и в сочетании с селективным термическим действием, посвящены работы (Simonenko et al., 2003; Anderson et al., 2006; Черкасова и др., 2007; Tuchin et al., 2009, 2010).

Анализ литературы показывает, что изучение действия света на фотосенсибилизированную ткань, в том числе и жировую, является актуальной задачей с точки зрения разработки фундаментальной проблемы фотобиологии животной клетки и развития новых технологий фототерапии.

Цель настоящей работы заключается в экспериментальном исследовании последствий оптического излучения на клетки сенсibilизированных красителем тонких срезов жировой ткани *in vitro* посредством цифровой микроскопии, а также в выявлении особенностей такого действия на основе статистического анализа микроизображений и оптической интерпретации наблюдаемых явлений. Заметим, что введенный нами термин «последствие» означает изменение оптических свойств исследуемой сенсibilизированной красителем жировой ткани после ее облучения светом, а не в процессе ее облучения. В литературе «последствие» относят к цепочке биологических эффектов, возникающих через некоторое время после облучения; эти эффекты остаются недостаточно изученными (Тучин, 2010; Wilson, 2010). В настоящей работе предлагается исследовать такие эффекты неинвазивными оптическими методами.

### Материал и методика

Объектом исследования являлась подкожная жировая ткань человека *in vitro*. После ее замораживания изготавливали тонкие срезы ткани толщиной 100–150 мкм. Фотосенсибилизацию образцов ткани осуществляли 40%-ным водно-спиртовым раствором БЗ (6 мг/мл) (ОАО Самарамедпром, Россия, Самарская обл., г. Чапаевск) (Narat, 2008). Приготовленный образец помещали на тер-

мостолдик микроскопа БИОЛАМ П2-1 (Tuchin et al., 2009), к окуляру которого присоединяли CCD-камеру, подключенную к персональному компьютеру. Диодную лампу (Ultra Lume Led 5) размещали на расстоянии 2 мм от образца, что обеспечивало плотность мощности 70 мВт/см<sup>2</sup> на длине волны 442 нм и 121 мВт/см<sup>2</sup> на длине волны 597 нм. Эффективность фототоксического действия обеспечивалась совпадением спектра излучения лампы со спектром поглощения БЗ (рис. 1). Диаметр светового пятна на биообъекте составлял 2 мм. Длительность облучения варьировали в пределах 3–15 мин. Инструментом для изучения влияния света на жировую ткань *in vitro* являлось периодическое микрофотографирование ткани по окончании облучения ее светом.

Анализ влияния излучения диодной лампы на клетки жировой ткани в присутствии фотосенсибилизатора предварялся рядом экспериментов; соответствующие фотографии показали следующее. Если образец ткани при ее физиологических температурах и чуть выше (в пределах 37–43 °С) не подвергался фотовоздействию, то оптические свойства ткани за время наблюдения не изменялись в следующих случаях: а) жировая ткань без какой-либо фотосенсибилизации и фотодействия; б) жировая ткань без какой-либо фотосенсибилизации, но облученная лампой в течение 5 мин; в) жировая ткань, обработанная спиртовым раствором в той же концентрации, что и концентрация спирта в растворе БЗ, но без светового облучения; г) жировая ткань, обработанная спиртовым раствором в той же концентрации, что и концентрация спирта в растворе БЗ в присутствии светового облучения; д) жировая ткань, обработанная водно-спиртовым раствором БЗ, но без светового облучения. Лишь эксперименты с комбинированным действием светового излучения на предварительно фотосенсибилизированные жировые клетки при варьировании температуры в пределах 37–43 °С приводили к видимым изменениям в структуре жировой ткани. При этом максимальное изменение оптических свойств образцов ткани происходило при температурах 39–43 °С и длительностях облучения 10–15 мин. Анализ особенностей этого эффекта — предмет настоящей работы.

Области образца, попадающие в поле зрения микроскопа, фотографировали до облучения объекта лампой, а затем — после облучения в виде серий фотокадров через равные промежутки времени с периодом около 5 мин. Изображения клеток, полученные с помощью микроскопа, фиксировали цифровой фотокамерой и передавали на персональный компьютер. Программное обеспечение для поддержки работы фотокамеры включает в себя программу Aver Media EZ Capture для управления камерой в операционной системе семейства Windows. Запись файлов изображений на диск осуществляется в формате BMP (Windows Bitmap). Статистическую обработку проводили с помощью программ MathCad.

### Результаты

На рис. 2, а, б представлены фотографии сенсibilизированной жировой ткани при температуре 41 °С до (рис. 2, а) и после ее облучения (рис. 2, б) спустя 115 мин. На рис. 2, а, б видно: 1) изготовленные слои жировой ткани толщиной 100–150 мкм не являются монослоями; оценки показывают, что размеры клеток жировой ткани в среднем составляют 50–80 мкм, что соответствует данным литературы (Gurt et al., 1982); 2) облучение фотосен-

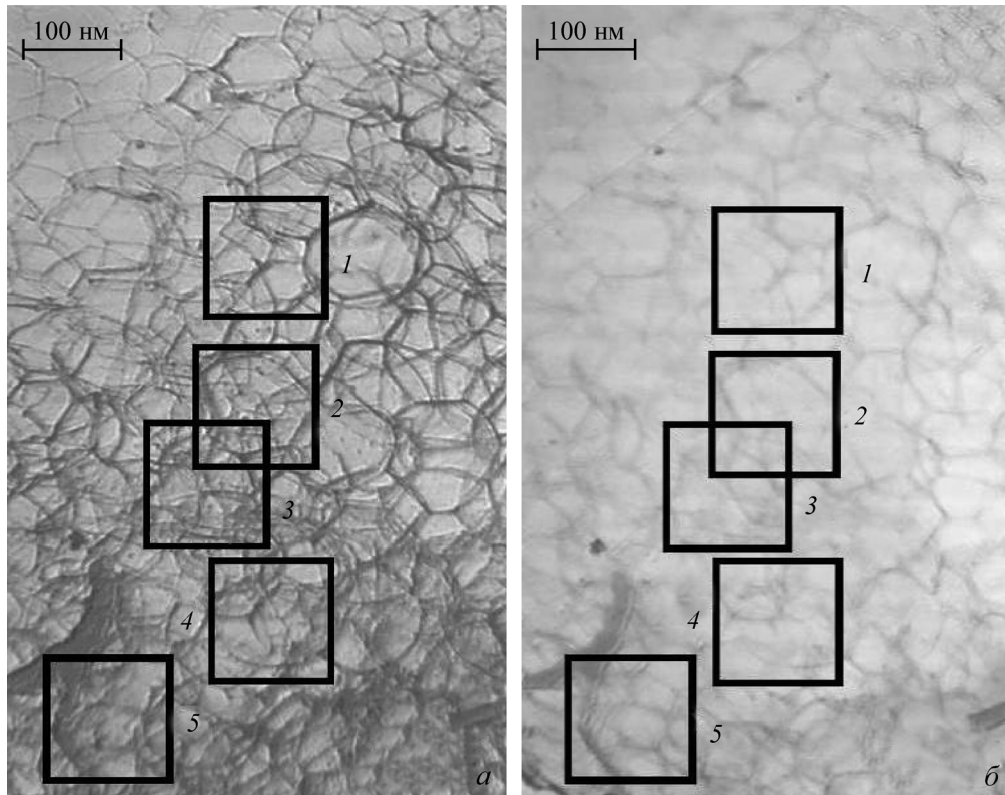


Рис. 2. Сенсибилизированная жировая ткань при 41 °С до (а) и после ее фотооблучения (б) спустя 115 мин.

1—5 — зоны жировой ткани, выбранные для статистической обработки результатов. Об. 6.3×.

сенсибилизированной жировой ткани изменяет оптические свойства ткани, ее структуру.

На этих же рисунках указаны пять зон исследуемой жировой ткани, выбранных для статистической обработки результатов. Эти же зоны, но в зависимости от времени инкубации отображены на рис. 3. Под термином «время инкубации» будем понимать интервал времени от момента окончания фотодействия на биообъект до момента фотографирования. В фотодинамической терапии этот период относится к интервалу времени развития фотобиологического эффекта (Wilson, 2010). Размер каждой из зон составлял 90×90 пикселей, при этом 1 пиксель соответствовал примерно 1 мкм. По фотокадрам рис. 3 можно проследить за временными изменениями структуры ткани, происходящими в каждой из зон в отдельности, а также сравнить фотокадры для разных зон в выбранный момент времени.

На рис. 3 видно: 1) световое облучение сенсибилизированной жировой ткани приводит к запуску некоего биологического процесса, изменяющего структуру ткани; 2) до 41—57 мин структура жировой ткани изменяется не столь заметно, а затем это изменение становится более радикальным; 3) через 57 мин временные изменения структуры жировой ткани замедляются, структура ткани становится более однородной; 4) зоны 4 и 5 в большей степени, чем зоны 1—3, сохраняют свою структуру через 57 мин инкубации, их изображение не становится столь однородным даже через 115 мин инкубации. Эти особенности процессов в облученной жировой ткани носят описательный характер; далее предпринята попытка их количественной оценки и выявления возможных причин, приводящих к изменениям оптических свойств ткани.

Статистическая обработка фотоизображений, их оптическая интерпретация. Статистическая обработка цифровых фотографий фотосенсибилизированной облученной биоткани в рамках избранных пяти зон (рис. 2, 3) позволяет провести количественное сравнение степени структурных изменений в исследуемых зонах ткани как во времени, так и в пространстве. Каждую из выбранных зон биоткани (например, для рис. 3 их количество с учетом числа фотокадров составляет 30 фотоизображений) оцифровывали по пикселям и рассматривали как статистическую выборку. Кодирование состояния одного пикселя с помощью одного байта позволяет передавать 256 различных оттенков серого цвета от полностью белого до полностью черного. С оптической точки зрения каждый элемент выборки, соответствующий данному пикселю, может рассматриваться как числовое значение оптической плотности фотосенсибилизированной биоткани, а анализируемые фотографии зон жировой ткани (рис. 3) — как распределение оптической плотности в рамках фотосенсибилизированной и облученной зоны образца.

При этом традиционно предполагается, что преобразование аналогового светового сигнала в цифровой код осуществляется линейным образом. В реальности световая характеристика фотоприемника является нелинейной, и избрание его лишь небольшого линейного участка, естественно, сужает динамические пределы регистрируемых световых потоков. В этой связи предварительно снимался аналог световой характеристики фотокамеры: на пути светового луча перед объективом микроскопа на предметный столик поочередно помещали нейтральные светофильтры определенной оптической плотности  $D$  и регистрировали фотокамерой величины яркости  $B$ . Экс-

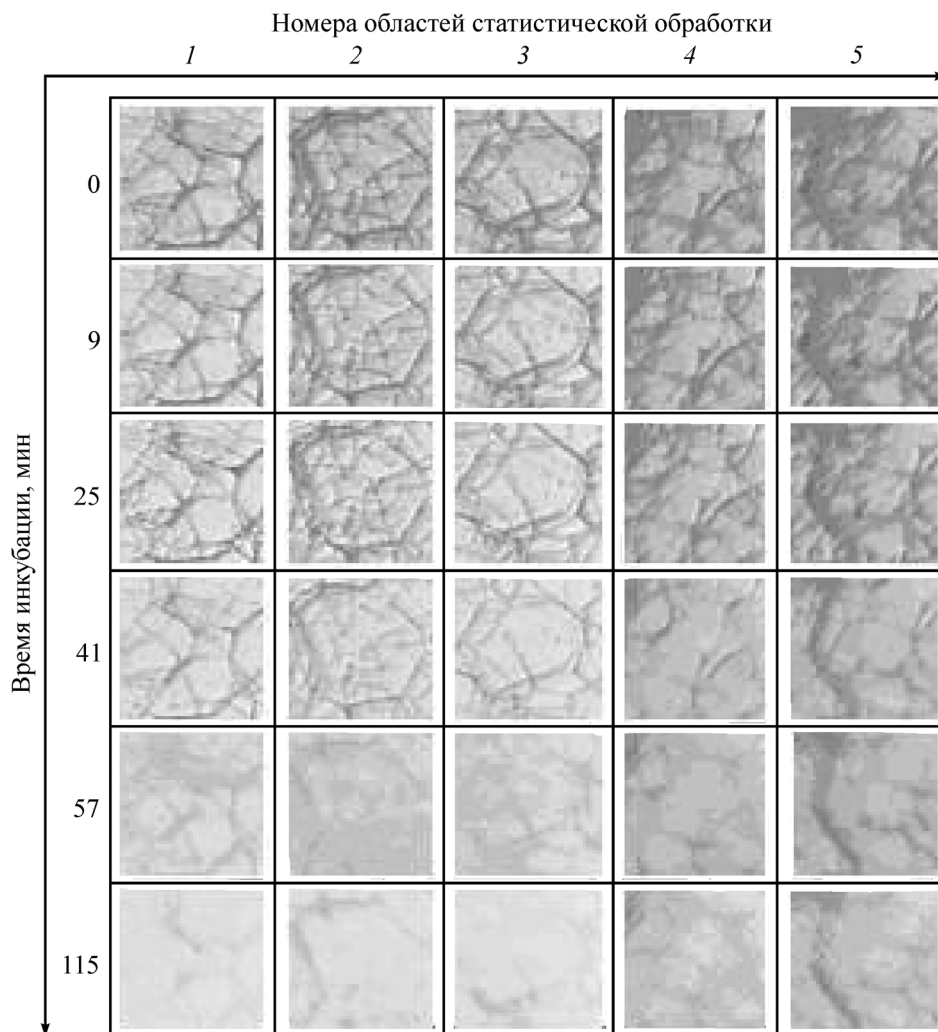


Рис. 3. Структура избранных зон сенсibilизированной жировой ткани (см. рис. 2) в зависимости от времени ее инкубации.

периментальные точки аппроксимировали полиномом четвертой степени вида:  $V = 256 - 238D - 195D^2 + 291D^3 - 84.06D^4$ . Полученная зависимость  $V(D)$  включала в себя линейную часть (пределы изменения яркости  $V$  от 1 до 130 единиц), а также кривую, соответствующую эффекту насыщения ( $V$  от 130 до 256 единиц яркости). При этом световой поток осветительной лампы микроскопа подбирали таким, чтобы в отсутствие светофильтров ( $D = 0$ ) величина яркости составляла  $V = 256$ .

Компьютерное преобразование найденной аппроксимации  $V(D)$  в зависимость  $D(V)$  позволяет установить калибровочную кривую, по которой каждому измеренному значению яркости  $V$  можно поставить в соответствие величину оптической плотности  $D$  образца. Естественно, учитывая спектр поглощения БЗ, измерения оптической плотности нейтральных светофильтров производили вблизи максимума поглощения БЗ ( $\lambda = 597$  нм). Такой подход нам представляется вполне корректным и в то же время позволяет расширить динамический диапазон регистрируемых световых потоков. Естественно, все последующие расчеты проводили с учетом найденной калибровочной кривой, аппроксимированной полиномом вида  $D = 2.01 - 0.046V + 4.67 \times 10^{-4}V^2 - 1.97 \times 10^{-6}V^3 + 2.88 \times 10^{-9}V^4$ .

На рис. 3 видно, что в анализируемых зонах с течением времени изменяется не только абсолютное значение  $D$ ,

но и его пространственное распределение. Можно предположить, что усредненное по площади зоны значение  $D_{\text{ср}}$  несет информацию о динамике процессов, происходящих в данной зоне сенсibilизированной облученной жировой ткани. В то же время величина стандартного отклонения  $\sigma(D)$  от  $D_{\text{ср}}$  зоны характеризует пространственное распределение оптической плотности, а следовательно, структуру ткани в зоне и ее временное изменение.

Для каждой из пяти выбранных зон (рис. 3) рассчитывали значения  $D_{\text{ср}}$  и  $\sigma(D)$  в зависимости от времени инкубации (всего 30 пар значений параметров  $D_{\text{ср}}$  и  $\sigma(D)$ ). Для примера на рис. 4 представлены результаты счета  $D_{\text{ср}}(t)$  для второй зоны фотосенсibilизированной БЗ и облученной ткани (рис. 4, кривая 1). Здесь же для сопоставления приведены зависимости оптической плотности от времени  $D_{\text{ср}}(t)$  для других условий экспериментов. На рис. 4 видно, что во всех случаях, кроме фотовоздействия с участием БЗ, оптическая плотность жировой ткани  $D_{\text{ср}}$  практически остается постоянной. И лишь сочетание фотосенсibilизации клеток ткани раствором БЗ со спектрально подобранным световым излучением приводит к существенным изменениям оптической плотности исследуемой ткани. На рис. 4 приведены графики зависимости  $D_{\text{ср}}(t)$  для различных экспериментальных условий без иллюстраций величин стандартного отклонения, чтобы исключить загромождение рисунка. Отметим, что с учетом

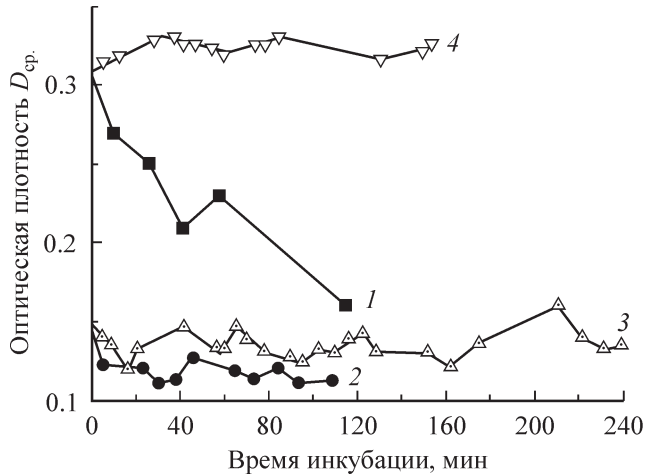


Рис. 4. Среднее по зоне наблюдения значение оптической плотности как функция времени инкубации биоткани.

1 — сенсибилизированная БЗ биоткань при 41 °С, облученная в течение 5 мин, 2 — биоткань под действием водно-спиртового раствора при 41 °С, 3 — биоткань под действием водно-спиртового раствора при 41 °С, облученная в течение 5 мин, 4 — сенсибилизированная БЗ биоткань при 41 °С;  $D_{cp}$  — среднее по зоне наблюдения значение оптической плотности  $D$  (здесь и на других рисунках).

стандартного отклонения кривые 2 и 3 оказываются практически неотличимыми.

На рис. 5 приведены те же кривые  $D_{cp}(t)$ , что и на рис. 4 для фотосенсибилизированной БЗ жировой ткани с ее световым облучением (кривая 1) и без такового (кривая 4), однако эти графики дополнены зависимостями стандартных отклонений  $\sigma(D)$  от времени инкубации ткани. Заметим, что на рис. 5 экспериментальные точки и соответствующая кривая отображают поведение зависимости  $D_{cp}(t)$  от времени инкубации образца  $t$ . Значения стандартных отклонений  $\sigma(D)$  как функция времени  $t$  обозначены пунктирными линиями по обе стороны относительно аппроксимации  $D_{cp}(t)$ . На рис. 5 видно: 1) процесс, запущенный в фотосенсибилизированной жировой ткани при облучении светом, носит нелинейный характер; отметим, что вид аналогичных графиков для других избранных зон биоткани практически идентичен; 2) запущенный механизм действует и после 120 мин эксперимента, хотя скорость этого процесса снижается; 3) размах величины стандартного отклонения  $\sigma(D)$  с течением времени в целом сужается.

Более детальное поведение стандартного отклонения  $\sigma(D)$  для второй зоны приведено на рис. 6 (графики для других зон аналогичны). Обращает на себя внимание, что в начальный период до 30-й мин величина  $\sigma(D)$  возрастает, а затем резко снижается, оставаясь постоянной после 60-й мин. На основании результатов, представленных на рис. 5, а также аналогичных для других исследуемых зон ткани, определена зависимость  $\sigma(D)/D_{cp}$  от времени инкубации  $t$  (рис. 7; для иллюстрации приведены кривые 1—3 лишь для зон 1, 2 и 4, для зон 3 и 5 графики аналогичны). На рис. 7 для избранных к иллюстрации зон (кривые 1—3) достаточно отчетливо прослеживаются 3 участка: первый участок  $a-b$ , на котором величина  $\sigma(D)/D_{cp}$  довольно медленно нарастает; второй участок  $b-c$ , где наблюдается резкое падение значений  $\sigma(D)/D_{cp}$ ; третий участок  $c-d$ , для которого  $\sigma(D)/D_{cp}$  практически не изменяется ( $\sigma(D)/D_{cp} \approx \text{const}$ ) (аналогично для зон 3, 5). Модуль производной функции  $\sigma(D)/D_{cp}$  по времени дает временное

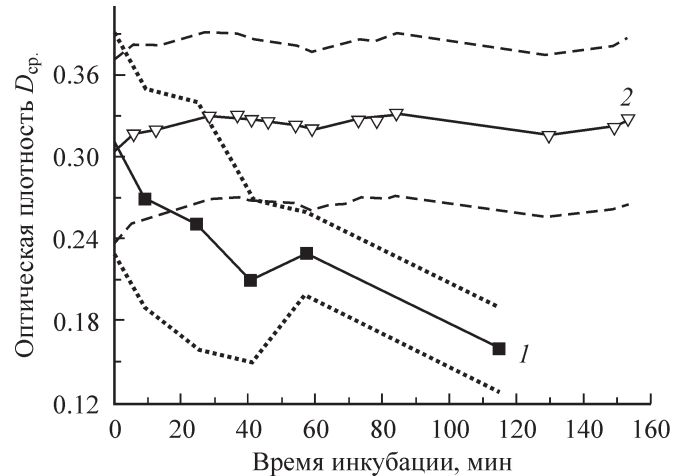


Рис. 5. Среднее по зоне наблюдения значение оптической плотности  $D_{cp}$  и отклонение  $\sigma(D)$  величины  $D$  от  $D_{cp}$  как функция времени инкубации биоткани для 2-й зоны (рис. 3).

1 — сенсибилизированная БЗ биоткань при 41 °С, облученная в течение 5 мин (сплошная линия — экспериментальные значения  $D_{cp}$ , пунктирные и штриховые линии означают нижнюю и верхнюю границы отклонения  $\sigma(D)$ ); 2 — сенсибилизированная БЗ биоткань при 41 °С (сплошная линия — экспериментальные значения  $D_{cp}$ , пунктирные и штриховые линии означают нижнюю и верхнюю границы отклонения  $\sigma(D)$ );  $\sigma(D)$  — стандартное отклонение оптической плотности  $D$  от среднего значения  $D_{cp}$  (здесь и на других рисунках).

расположение максимума ее скорости  $t_{max}$ , а следовательно, процесса трансформации клеток жировой ткани:  $t_{max}$  лежит в пределах 40—50 мин времени инкубации образца (рис. 8).

На рис. 9 показано распределение оптической плотности  $D$  по диаметру выбранной клетки второй зоны в различные моменты времени. Рассмотрим две области графиков на рис. 9: 1) области, соответствующие межклеточным пространствам: резкие «пики»  $D$  в точках  $x_1 \sim 7.6$  и  $x_2 \sim 85.6$  мкм; 2) области, соответствующие мембране избранной клетки, выделенные на рис. 9 прямоугольником. Расстояние  $\Delta x = x_2 - x_1$  адекватно размеру избранной клетки, оно составляет величину около 80 мкм,

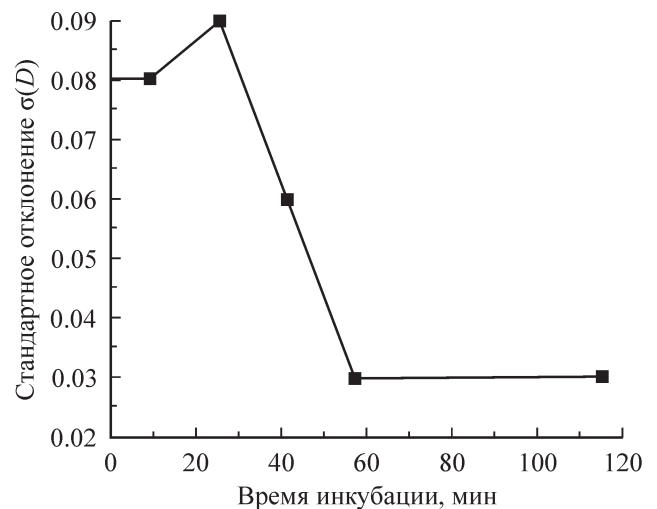


Рис. 6. Зависимость стандартного отклонения  $\sigma(D)$  величины  $D$  относительно  $D_{cp}$  от времени инкубации биоткани для 2-й зоны (график построен по результатам рис. 4).

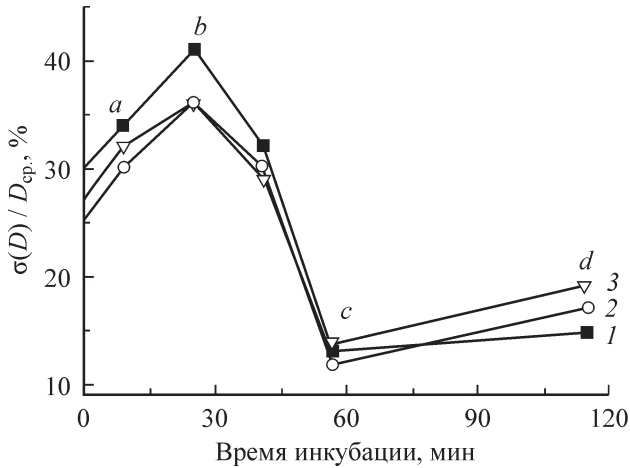


Рис. 7. Зависимость относительного отклонения значения оптической плотности от среднего значения  $D_{cp}$ , т. е.  $\sigma(D)/D_{cp}$ , от времени инкубации биоткани для трех избранных ее зон (рис. 3).

Кривые 1—3 относятся к 1, 2 и 4-й зонам соответственно. Остальные пояснения см. в тексте.

что соответствует данным других авторов (Gurr et al., 1982). На рис. 9 видно, что с течением времени (время инкубации биообъекта) величина «пика»  $D$  снижается. Более детальное поведение  $D$  в области межклеточного пространства, например для координаты  $x_1 \sim 7.6$  мкм, приведено на рис. 10, на котором видно, что средний размер межклеточного пространства составляет величину поряд-

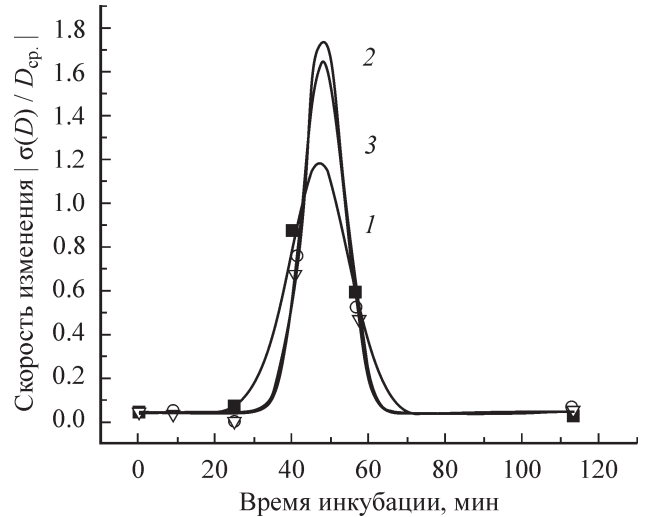


Рис. 8. Скорость изменения модуля относительного отклонения значения оптической плотности биоткани от среднего значения  $|\sigma(D)/D_{cp}|$  как функция времени инкубации для трех избранных зон (рис. 3).

Кривые 1—3 относятся к 1, 2 и 4-й зонам соответственно.

ка 3—5 мкм, что также соответствует литературным данным (Gurr et al., 1982). Кроме того, рис. 10 демонстрирует уменьшение оптической плотности  $D$  межклеточного пространства за время инкубации жировой ткани и практическое выравнивание  $D$  по отношению к иным фрагментам жировой ткани.

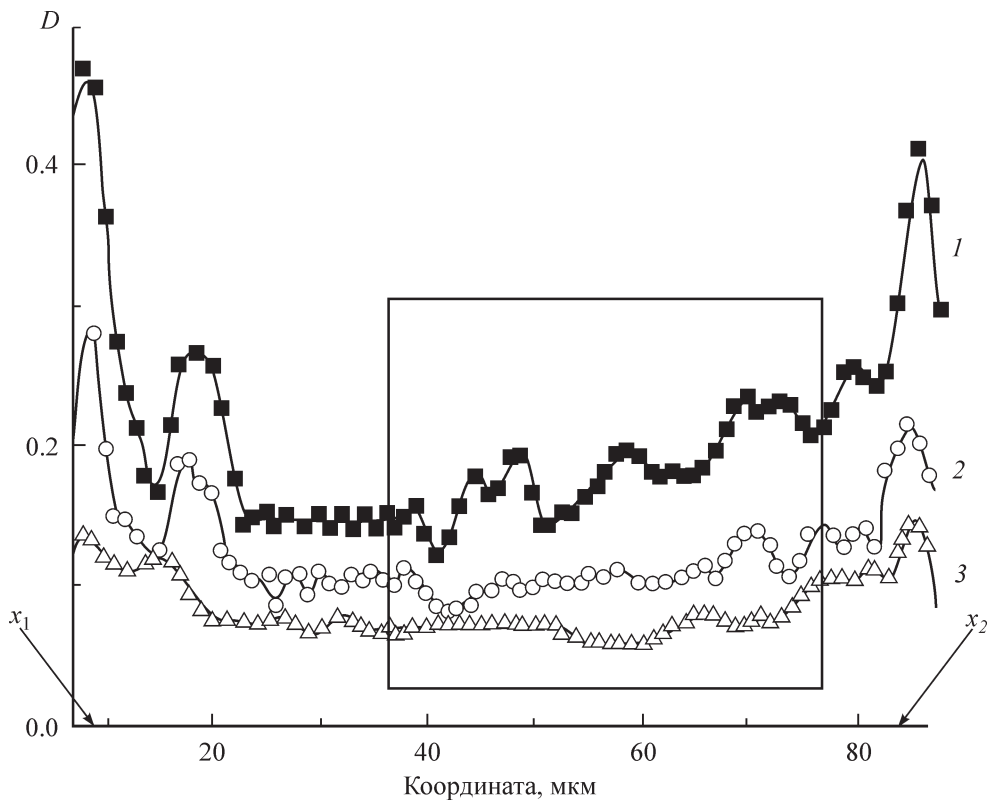


Рис. 9. Распределение числовых значений оптической плотности  $D$  по диаметру выбранной клетки 2-й зоны биообразца в различные избранные моменты времени  $t$ .

Для кривых 1—3 время инкубации  $t = 0, 41$  и  $115$  мин соответственно. Координаты  $x_1$  и  $x_2$  по диаметру избранной клетки соответствуют центрам межклеточного пространства.

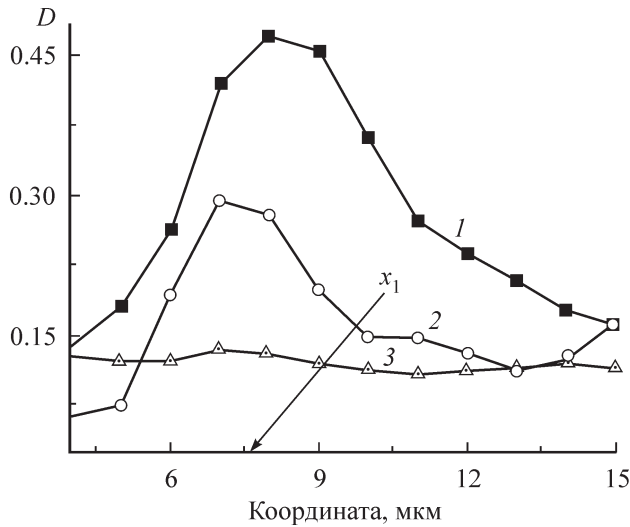


Рис. 10. Распределение числовых значений оптической плотности  $D$  межклеточного пространства в области координаты  $x_1 \sim 7.6$  мкм (левый «пик» значений  $D$  на рис. 8) в различные моменты времени.

Для кривых 1—3 время инкубации  $t = 0, 41$  и  $115$  мин соответственно. Координата  $x_1$  по диаметру избранной клетки соответствует центру межклеточного пространства ( $x_1 \sim 7.6$  мкм).

С целью анализа пространственной неравномерности обнаруженного эффекта фотодействия в рамках даже одной клетки проводили оценку изменения оптической плотности в различных точках второй зоны в пределах прямоугольника, выделенного на рис. 9. Для этого, например, относительно координат  $x_3 = 40, x_4 = 58$  и  $x_5 = 73$  мкм выбирали области шириной по 3 мкм каждая, в рамках этих узких областей находили средние значения оптической плотности в каждый момент времени. Нахождение величины  $\Delta D/\Delta t$  позволяет определить скорость процесса в биоткани в любой ее точке в зависимости от времени. При этом величине  $\Delta D$  соответствовало расстояние меж-

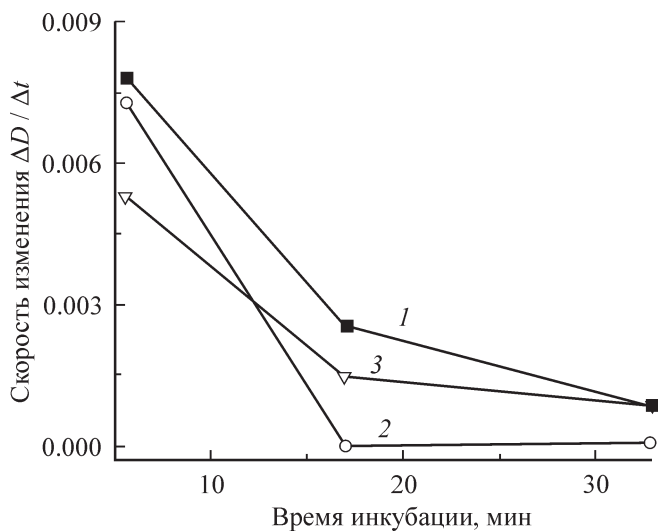


Рис. 11. Зависимость скорости изменения оптической плотности клетки жировой ткани  $\Delta D/\Delta t$  от времени ее инкубации  $t$  в точках мембраны клетки с координатами  $x_3, x_4$  и  $x_5$ .

Кривые 1—3 относятся к  $x_3 = 40, x_4 = 58$  и  $x_5 = 73$  мкм соответственно. Координаты  $x_3, x_4$  и  $x_5$  соответствуют точкам мембраны избранной клетки по ее диаметру.

ду соседними кривыми (рис. 9) в данной точке с координатой  $x$ , а за  $\Delta t$  принимали интервал времени, соответствующий разности времен инкубации биообразца для этих соседних графиков. Естественно, что в пределах соседних графиков скорость исследуемого процесса считали постоянной, однако для различных пар графиков она изменялась во времени (рис. 11). На рис. 11 видно, что скорость «просветления» биоткани и ее временное изменение в различных областях ткани различны, что свидетельствует о неравномерности процесса, запущенного в клетке жировой ткани фотодействием.

Результаты, представленные на рис. 5 и 9, обобщаются на рис. 12. Здесь показано поведение во времени величины  $D$  относительно его значения в начальный момент времени  $D_0 (t = 0)$ , т. е. величины  $(D/D_0)$ . Нормировка  $D$  относительно  $D_0$  необходима для совмещения результатов, отображенных на рис. 5 и 9. На рис. 12 видно, что «просветление» (снижение  $D$ ) межклеточного пространства (кривые 1 и 2) происходит значительно быстрее, чем области мембраны клетки (кривая 4). Кроме того, легко видеть, что скорость изменения среднего по площади зоны значение  $D_{cp}$  относительно  $D_0$  (кривая 3) превосходит ту же величину  $(D/D_0)$  для области мембраны клетки, однако уступает скорости изменения этого параметра для межклеточного пространства.

### Обсуждение

Поведение относительного стандартного отклонения во времени  $\Delta(D)/D_{cp}$  (рис. 7) показывает: на первом участке (примерно до 30 мин) структурные перестройки в ткани происходят медленно, причем эти перестройки приводят к увеличению  $\Delta(D)/D_{cp}$ ; на втором временном интервале (с 30 до 60 мин) происходит сначала медленная, а

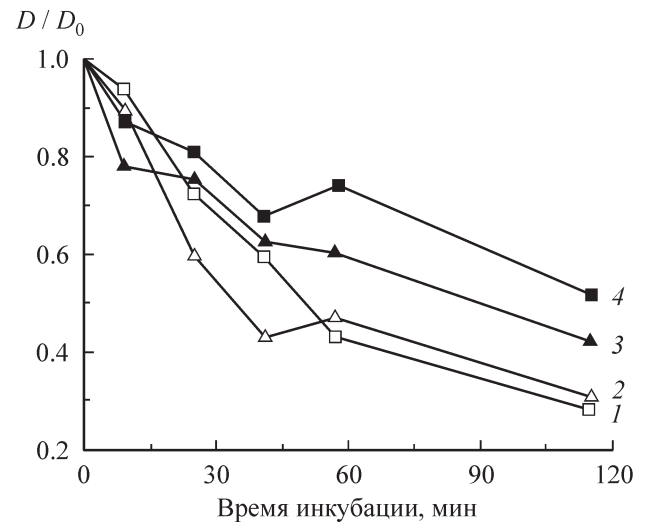


Рис. 12. Нормированные значения оптической плотности  $D$  для разных областей жировой ткани 2-й зоны и среднее значение  $D_{cp}$  по всей 2-й зоне на соответствующие их начальные значения  $D_0$ , т. е. при  $t = 0$  ( $D_0$  различно для разных областей анализируемой зоны) как функции времени инкубации.

Кривая 1 относится к межклеточному пространству в области координаты  $x_1 \sim 7.6$  мкм; 2 — к межклеточному пространству в области координаты  $x_2 \sim 85.6$  мкм; 3 — к нормированному среднему по второй зоне наблюдения  $D_{cp}$  на  $D_0$ , т. е.  $(D_{cp}/D_0)$  (график заимствован из рис. 4); 4 — к нормированному значению  $D_{cp}$  на  $D_0$ , т. е.  $(D_{cp}/D_0)$  в области внутриклеточного пространства с координатами 23—77 мкм.

Содержание жирных кислот (ЖК) и их характеристика в жировой ткани человека

ЖК	Химическая формула	Молекулярная масса, Да	Размер молекулы, нм	Показатель преломления (°C)	Содержание ЖК в жировой ткани человека, %
Насыщенные ЖК					
Миристиновая	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> COOH	228.36	0.8—1.6	1.4273 (70 °C)	3
Пальмитиновая	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> COOH	256.42	0.9—1.8	1.4272	20
Стеариновая	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> COOH	284.47	1.0—2.0	1.4299	5
Ненасыщенные ЖК					
Пальмитино-олеиновая	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> COOH	226.35	0.8—1.6	1.4360 (60 °C)	5
Олеиновая	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> COOH	282.45	1.0—2.0	1.4470 (60 °C)	46
Линолевая	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> COOH	280.44	1.0—2.0	1.4690 (60 °C)	10

Примечание. Использованы источники: Кнунянц, 1961; Belikov, 2003.

затем более резкая трансформации структуры биоткани; третий участок (после 60-й мин) — структурные изменения в ткани практически завершены,  $\sigma(D)/D_{\text{ср}}$  практически не меняется. При этом мы избегаем термина «деструкция ткани», так как на рис. 3 достаточно уверенно просматриваются жировые клетки даже после  $t = 115$  мин.

Наблюдаемые характерные временные участки (рис. 7) могут быть объяснены следующим образом. В период до 30-й мин как результат фотовоздействия в мембранах клеток, возможно, образуются поры, которые увеличивают проницаемость мембран для молекул как извне (Tuchin, 2006), так, можно предположить, и изнутри. Частично содержимое жировых клеток поступает в межклеточное пространство, что приводит к выравниванию показателей преломления межклеточной жидкости и самой клетки. Отметим, что показатель преломления жировой ткани человека составляет  $n_{\text{жс}} = 1.44$  (Tuchin, 2006) и главным образом определяется показателем преломления липидов, составляющих основу жировой ткани. В свою очередь показатель преломления межклеточной жидкости составляет  $n_{\text{м}} = 1.36$  (Тучин, 2010). Естественно, поступление молекул липидов в виде свободных жирных кислот из клетки в межклеточное пространство увеличивает показатель преломления межклеточной жидкости. Показатель преломления  $n_{\text{м}}$  приближается к  $n_{\text{жс}}$ , тогда в соответствии с оптическими принципами среда становится оптически более однородной, прозрачной. Это ведет к увеличению коэффициента пропускания, а следовательно, к снижению оптической плотности  $D_{\text{ср}}$  и как результат — увеличению  $\sigma(D)/D_{\text{ср}}$  (рис. 7). Параллельно к увеличению  $\sigma(D)/D_{\text{ср}}$  приводит не только снижение  $D_{\text{ср}}$ , но и возрастание на начальном (до 30-й мин) участке  $t$  величины  $\sigma(D)$ , что видно на рис. 6. Возможно, это обусловлено неравномерностью образования пор в мембранах как во времени, так и в пространстве, о чем свидетельствуют графики на рис. 11. Действительно, на рис. 11 видно, что в разных точках мембраны клетки скорость наблюдаемого процесса  $\Delta D/\Delta t$  и характер его временного изменения различны.

К 30-й мин среда становится оптически более однородной, величина  $\sigma(D)$  снижается более резко, чем величина  $D_{\text{ср}}$ , и как итог наблюдается резкое снижение величины  $\sigma(D)/D_{\text{ср}}$ , что можно связать с ростом количества образовавшихся пор в мембранах и соответственно с интенсивным поступлением внутриклеточной жидкости в

межклеточное пространство. Этот процесс занимает 30 мин (с 30-й по 60-ю мин, рис. 7). В дальнейшем после 60-й мин оптические свойства жировой ткани практически перестают изменяться,  $\sigma(D)/D_{\text{ср}} \approx \text{const}$ , что можно связать с прекращением поступления содержимого клеток в межклеточное пространство из-за возникших при фотовоздействии пор в мембранах жировых клеток.

Временные масштабы открытия пор различных клеток и их закрытия после физического (лазерной ударной волной) или химического (спиртом или ДМСО) воздействия, а также размеры изученных к настоящему времени молекул и частиц, проникающих через клеточную мембрану таким способом (Bommannan et al., 1991; Lee et al., 1996, 1997, 2002; Sznitowska, 1996; McAuliffe et al., 1997; Levang et al., 1999; Squier et al., 2003; Tuchin, 2006), в общем, отвечают предложенному механизму частичного лизиса жировых клеток при фотовоздействии. Заметим, что под термином «частичный лизис» понимается частичное разрушение клеток, без полной их деструкции в результате повреждения или разрыва оболочек, что приводит к частичному выходу содержимого клеток наружу и может быть обратимым (Bommannan et al., 1991; Альбертс и др., 1994; Lee et al., 1996, 1997, 2002; Sznitowska, 1996; McAuliffe et al., 1997; Levang et al., 1999; Squier et al., 2003; Tuchin, 2006).

Бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу любой клеточной мембраны. В процессе жизнедеятельности непрерывность бислоя может нарушаться с образованием структурных дефектов. Естественно, что при этом происходит изменение проницаемости и стабильности мембраны. В зависимости от воздействия — осмотическим шоком (Антонов и др., 2000), спиртом (Bommannan et al., 1991; Sznitowska, 1996; Levang et al., 1999; Squier et al., 2003) или лазерным фотомеханическим стрессом (Lee et al., 1996, 1997, 2002; McAuliffe et al., 1997; Kim, Geronemus, 2006; Lukac et al., 2009) — поры могут быть разной величины — от нескольких нанометров (Bommannan et al., 1991; Sznitowska, 1996; Levang et al., 1999; Антонов и др., 2000; Squier et al., 2003) до 100 нм (Lee et al., 2002). Размеры таких пор достаточны для выхода различных веществ, содержащихся в цитоплазме клеток (см. таблицу). Выход веществ сопровождается в свою очередь снижением разности осмотического давления, при этом натяжение мембраны уменьшается и поры затягиваются (Антонов и др., 2000).



Предложенная трактовка наблюдаемого эффекта объясняет не только увеличение однородности структуры жировой ткани (снижение  $\sigma(D)$ ), но и ее просветление в целом (снижение  $D_{cp}$ ). Действительно, трансформация жировой ткани в оптически более однородную снижает степень рассеяния света — однородные среды свет не рассеивают. В свою очередь снижение светорассеяния уменьшает эффективность поглощения света сенсibilизатором, что также несколько просветляет среду (Тучин и др., 2001) и соответственно уменьшает  $D_{cp}$ .

Предложенная трактовка наблюдаемого эффекта подтверждается и графиками на рис. 9, 10 и 12. Действительно, на этих рисунках видна кинетика изменения оптической плотности  $D$  как в областях межклеточного пространства и мембраны клетки, так и интегрально по всей выбранной зоне образца жировой ткани. На рис. 9, 10 и 12 показано, что общее наблюдаемое «просветление» жировой ткани, а также ее трансформация в оптически более однородную среду обусловлены в основном процессами в межклеточном пространстве, изменением показателя преломления межклеточной жидкости. Отметим, что единственным источником жидкости для поступления в область межклеточного пространства и как следствие изменения показателя преломления межклеточной жидкости является непосредственно жировая клетка. Поэтому можно утверждать, что наблюдаемый эффект просветления жировой ткани после ее фотосенсибилизации и облучения светом обусловлен частичным лизисом ее клеток, при этом их целостность сохраняется, полная деструкция клеток жировой ткани отсутствует. Следует отметить, что термин «липолиз» в настоящее время трактуется расширенно не только классически как влияние липазы на процесс расщепления жиров на составляющие их жирные кислоты, но и как частичное или полное разрушение жировых клеток с выделением их содержимого в межклеточное пространство (Kim, Geronemus, 2006; Lukas et al., 2009).

Очевидно, что при использовании других, более жестких условий фотовоздействия можно произвести и полную деструкцию клеток. Это произойдет, когда число микроповреждений мембраны жировых клеток превысит пороговое значение, при котором становится невозможным возвращение клеток к их нормальному функционированию. При таком фотовоздействии клетки погибают по сценарию апоптоза или некроза.

Таким образом, световое облучение фотосенсибилизированных БЗ жировых клеток приводит к запуску фотобиологических процессов, изменяющих структуру жировой ткани. Статистическая обработка цифровых фотографий позволяет количественно оценить степень и кинетику действия светового излучения на фотосенсибилизированную биоткань. Анализ изменения оптических свойств фотосенсибилизированной жировой ткани после ее облучения светом позволило предложить возможный механизм фотодействия — частичный лизис (липолиз) жировых клеток без их деструкции через образование временных пор в клеточной мембране.

В настоящей работе впервые показаны возможности БЗ как эффективного красителя со спектром поглощения, важным в применении для реализации как поверхностных воздействий света на биоткань (пик поглощения на 440 нм), так и глубинных (более интенсивный пик поглощения на 650 нм). Однако остается невыясненной природа фотобиологического действия этого красителя. Из широкой практики и новейших исследований (Narat, 2008) следуют лишь его хорошие антисептические свойства без

применения света. Для выявления механизмов фотобиологического действия необходимы прямые или косвенные измерения генерации синглетного кислорода или других радикалов в процессе воздействия (фотодинамический эффект), а также образования фототоксических продуктов в процессе облучения красителя в условиях разведения, близкого к использованному в настоящей работе.

Следует отметить, что предложенный в данной работе статистический метод обработки цифровых фотографий для анализа светового действия на фотосенсибилизированную жировую ткань, а также кинетики изменения оптических свойств исследуемой ткани может оказаться весьма перспективным инструментом в оценке пространственных или временных изменений структуры и других биологических объектов.

### Список литературы

- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. 1994. Молекулярная биология клетки. М.: Мир. 517 с.
- Антонов В. Ф., Черныш А. М., Пасечник В. И., Вознесенский С. А., Козлова Е. К. 2000. Биофизика. М.: Гуманитарный издательский центр ВЛАДОС. 287 с.
- Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. 2006. Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебник для вузов. М.: Дрофа. 287 с.
- Игнатьева Н. Ю., Гроховская Т. Е., Лукин В. В. 2002. Лазерно-индуцированные структурные и химические изменения жировой ткани. Журн. физ. хим. 76 (8) : 1357—1364.
- Кнунянц И. Л. 1961. Краткая химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия. 631 с.
- Красновский А. А. 2004. Фотодинамическое действие и синглетный кислород. Биофизика. 49 (2) : 305—322.
- Меерович Г. А., Стратонников А. А., Лоценов В. Б., Коган Е. А., Гладских О. П., Лукьянец Е. А., Ворожцов Г. Н., Пальцев М. А. 2000. О влиянии параметров лазерного облучения на механизмы повреждения опухолей при ФДТ. Лазерная медицина. 4 (4) : 19—22.
- Странадко Е. Ф., Титова В. А., Рябов М. В., Петровский В. Ю. 2006. Фотодинамическая терапия рака нижней губы: опыт применения в комбинации с традиционными методами профилактики метастазирования. Лазерная медицина. 10 (3) : 41—47.
- Толстых П. И., Клебанов Г. И., Шехтер А. Б., Толстых М. П. 2002. Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв. М.: Эко. 238 с.
- Тучин В. В. 2010. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М.: Физматлит. 479 с.
- Тучин В. В., Баикатов А. Н., Генина Э. А., Синичкин Ю. П., Лагодина Н. А. 2001. *In vivo* исследование динамики иммерсионного просветления кожи человека. Письма в ЖТФ. 27 (12) : 10—14.
- Черкасова О. А., Тучин В. В., Пономарева Е. Г., Никитина В. Е. 2007. Влияние бактериального лектина и роль его углеводсвязывающего центра при воздействии на адипоциты при повышенной температуре. Биофизика. 52 (4) : 687—693.
- Altshuler G. B., Anderson R. R., Manstein D., Zenzie H. H., Smirnov M. Z. 2001. Extended theory of selective photothermolysis. *Lasers in Surgery and Medicine*. 29 : 416—432.
- Anderson R. R., Farinelli W., Laubach H., Manstein D., Yaroslavsky A. N., Gubeli J. III., Jordan K., Neil G. R., Shinn M., Chandler W., Williams G. P., Benson S. V., Douglas D. R., Dylla H. F. 2006. Selective photothermolysis of lipid rich tissues: a free electron laser study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 38 : 913—919.
- Belikov A. V., Prikhodko C. V., Smolyanskaya O. A. 2003. Study of thermo-induced changes resulted in optical properties of fat tissue. *Proc. SPIE*. 5066 : 207.

- Bommannan D., Potts R. O., Guy R. H. 1991. Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum *in vivo* using infrared spectroscopy. *J. Control Release*. 16 : 299—304.
- Chen W. R., Adams R. L., Heaton S., Dickey D. T., Bartels K. E., Nordquist R. E. 1995. Chromophore-enhanced laser-tumor tissue photothermal interaction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett.* 88 : 15—19.
- Chen W. R., Li X., Naylor M. F., Liu H., Nordquist R. E. 2010. Advances in cancer photothermal therapy. In: *Handbook of photonics for medical science*. London: CRC Press, Taylor & Francis Group. 739—761.
- Engel E., Schraml R., Maisch T., Kobuch K., Konig B., Szeimies R.-M., Hillenkamp J., Bäuml W., Vasold R. 2008. Light-induced decomposition of indocyanine green. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (5) : 1777—1783.
- Fatemi A. 2010. Superiority of laser assisted liposuction. Analysis by endoscopy and histology. In: *LASER Europe 2010*. Tarragona, Spain. 256—260.
- Fickweiler S., Szeimies R. M., Baumler W., Steinbach P., Karner S., Goetz A. E., Abels C., Hofstadter F., Landthaler M. 1997. Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects *in vitro*. *J. Photochem. Photobiol.* 38 : 178—183.
- Gurr M. I., Jung R. T., Robinson M. P. 1982. Adipose tissue cellularity in man: the relationship between fat cell size and number, the mass and distribution of body fat and the history of weight gain and loss. *Int. J. Obesity*. 6 : 419—436.
- Hamblin M., Mroz P. 2008. *Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical*. Boston. London. Artec. 559 p.
- Huang Y.-Y., Chen A. C.-H., Hamblin M. R. 2010. Advances in low-intensity laser and phototherapy. In: *Handbook of photonics for medical science*. London: CRC Press. 687—716.
- Karu T. I. 2003. Low-power laser therapy. In: *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press. 48-1—48-25.
- Kim K. H., Geronemus R. G. 2006. Laser lipolysis utilizing a novel Nd : YAG laser. *Dermatol. Surg.* 32 : 241—248.
- Lee S., Anderson T., Zhang H., Flotte T. J., Doukas A. G. 1996. Alteration of cell membrane by stress waves *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.* 22 : 1285—1293.
- Lee S., McAuliffe D. J., Kollias N., Flotte T. J., Doukas A. G. 2002. Photomechanical delivery of 100-nm microspheres through the stratum corneum: implications for transdermal drug delivery. *Laser Surg. Med.* 31 : 207—210.
- Lee S., McAuliffe D. J., Zhang H., Xu Z., Taitelbaum J., Flotte T. J., Doukas A. G. 1997. Stress-waves-induced membrane permeation of red blood cells is facilitated by aquaporins. *Ultrasound Med. Biol.* 23 : 1089—1094.
- Levang A. K., Zhao K., Singh J. 1999. Effect of ethanol/propylene glycol on the *in vitro* percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and macroscopic barrier properties of the skin. *Int. J. Pharm.* 181 : 255—263.
- Lukac M., Vizintin Z., Zabkar J., Pirnat S. 2009. QCW pulsed Nd : YAG 1064 nm laser lipolysis. *J. Laser and Health Acad.* 4/1 : 5—17.
- McAuliffe D. J., Lee S., Zhang H., Flotte T. J., Doukas A. G. 1997. Stress-waves-assisted transport through the plasma membrane *in vitro*. *Laser Surg. Med.* 20 : 216—222.
- Narat J. 2008. Brilliant green. A clinical study of its value as a local antiseptic. *Amer. J. Surg.* 36 : 54—56.
- Simonenko G. V., Cherkasova O. V., Denisova T. P., Tuchin V. V. 2003. Thermal action on the lipocells. Washington; Bellingham: Proc. SPIE. 5068 : 458—470.
- Solarte E., Isaza C., Creollo W., Rebolledo A., Arrogate J., Ramirez H., Neira R. 2003. *In vitro* effects of 635 nm low intensity diode laser irradiation on the fat distribution of one adipose cell. Washington; Bellingham. Proc. SPIE. 4829 : 994—996.
- Squier C. A., Kremer M. J., Wertz P. W. 2003. Effect of ethanol on lipid metabolism and epidermal permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J. Oral Pathol. Med.* 32 : 595—599.
- Sznitowska M. 1996. The influence of ethanol on permeation behavior of the porous pathway in the stratum corneum. *Int. J. Pharmacol.* 137 : 137—140.
- Tsai C. L., Chen J. C., Wang W. J. 2001. Near-infrared absorption property of biological soft tissue constituents. *J. Med. Biol. Eng.* 21 : 7—14.
- Tuchin V. V. 2006. *Optical clearing of tissues and blood*. SPIE Press Monograph. 154. Bellingham; Washington: SPIE Press.
- Tuchin V. V., Altshuler G. B., Kochubey V. I., Simonenko G. V. 2010. Fat tissue staining and photodynamic/photothermal effects. Proc. SPIE. Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VII. 7563 : 75630V.
- Tuchin V. V., Yanina I. Yu., Simonenko G. V. 2009. Destructive fat tissue engineering using photodynamic and selective photothermal effects. Washington; Bellingham: Proc. SPIE. 7179 : 7170—7181.
- Wanner M., Avram M., Gagnon D., Mihm M. C., jr., Zurakowski D., Watanabe K., Tannous Z., Anderson R. R., Manstein D. 2009. Effects of noninvasive, 1210 nm laser exposure on Adipose tissue: results of a human pilot study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 41 : 401—407.
- Wilson B. C. 2010. Photodynamic therapy/diagnostics: principles, practice and advances. In: *Handbook of photonics for medical science*. London: CRC Press. 649—686.

Поступила 10 VIII 2010

PHOTODYNAMIC EFFECT ON CELLS OF HUMAN ADIPOSE TISSUE *IN VITRO*V. A. Doubrovski,<sup>1</sup> B. A. Dvorkin,<sup>1</sup> I. Yu. Yanina,<sup>2</sup> V. V. Tuchin<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Saratov State Medical University, <sup>2</sup> Saratov State University  
and <sup>3</sup> Institute of Precise Mechanics and Control RAS, Saratov;  
e-mail: mbf@sgmu.ru

Changes in optical properties of human adipose tissue cells after photodynamic exposure *in vitro* were found and investigated. Analysis of the kinetics of the process was realized by means of photomicrography of the object investigated. The statistical computer processing of digital photos obtained gave us an opportunity to estimate quantitatively the kinetics of photodynamic effect upon the tissue. Optical interpretation of the photos obtained indicates that the observed phenomenon corresponds to the partial lysis of adipose tissue cells without their complete destruction.

Key words: photodynamic effect, adipose tissue cells, statistical processing of digital photos.