

УДК 543.422.2, 591.83, 547.962.9

ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПРИ ИК-ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

С.В. Аверкиев, Н.Ю. Игнатъева, Э.Н. Соболев, В.В. Лунин, В.Н. Баграташвили

(кафедра физической химии)

Представлены спектры комбинационного рассеяния интактных и подвергнутых ИК-лазерному воздействию умеренной интенсивности препаратов хрящевой и фиброзной соединительной тканей с разным содержанием воды. Показано, что основное отличие спектров хрящевой и фиброзной соединительных тканей наблюдается в области сахарных колец ($960\text{--}1175\text{см}^{-1}$). Обсуждается изменение относительных интенсивностей и частот полос Амида I и III при разной влажности и после лазерного воздействия. Отличие спектров комбинационного рассеяния интактных и облученных образцов связано с денатурацией коллагена и изменением конформаций полисахаридных цепей.

Заболевания, повреждения и старение приводят к биохимическим и структурным изменениям тканей. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) позволяет извлекать информацию о состоянии биологического материала и регистрировать его изменения *in situ* [1]. В данной работе метод спектроскопии КР использовали для анализа структурных изменений в соединительных тканях при изменении степени гидратации и в результате ИК-лазерной обработки.

В настоящее время обработка соединительных тканей ИК-лазерным излучением умеренной интенсивности (доабляционный режим) благодаря своей экспрессности, бескровности и локальности воздействия [2, 3] является перспективным и многообещающим методом в пластической хирургии. Ранее было показано, что при ИК-лазерном облучении до температуры 50°C происходит изменение четвертичной структуры соединительных тканей. Денатурация коллагена (переход тройная спираль – случайный клубок) в соединительных тканях протекает в том случае, если температура лазерной обработки превышает 70°C [4]. Известно, что после денатурации коллагена в соединительных тканях все группы полос амидов претерпевают значительные изменения, такие как уширение, изменение интенсивности, частоты, а также тонкой структуры составляющих их полос [1, 5–7]. Цель данной работы заключалась в регистрации методом спектроскопии КР изменений в хрящевой и фиброзной соединительной тканях, вызванных ИК-лазерным излучением.

Материалы и методы

Приготовление образцов

Исходными материалами служили гиалиновый хрящ носовой перегородки и фиброзная соединительная ткань (ФСТ), выделенная из лицевых мышц. Ткани были изъяты у поросят в возрасте 6 мес. Непосредственно после изъятия из хрящевой ткани нарезали образцы толщиной 1,0–1,2 мм для облучения ИК-лазером. Облученные и интактные образцы обезвоживали над P_2O_5 и помещали в эксикаторы с растворами неорганических солей и серной кислоты разной концентрации. Температура окружающей среды составляла $21\pm 0,5^\circ\text{C}$ [8, 9].

ФСТ последовательно отмывали в воде, выдерживали в ацетоне (4°C , 12 ч) и диэтиловом эфире (25°C , 4 ч), вновь промывали водой, а затем высушивали на воздухе. Эта обработка приводила к практически полной экстракции липидов из ткани (эндотермический эффект плавления жиров на термограммах не проявляется [4]). Полученные препараты содержали 60–80% коллагена.

Образцы ФСТ, набухавшие в 0,15 Н растворе NaCl в течение 3 ч, подвергали лазерной обработке. Затем препараты высушивали над P_2O_5 в течение 3 сут, после чего помещали в эксикаторы с растворами неорганических солей и серной кислоты. Температура окружающей среды составляла $21\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Количество адсорбированной воды определяли гравиметрическим методом с точностью до 0,0001 г. Отметим, что выдерживание образцов в эксикаторах в течение 24 ч оказалось достаточным для достиже-

ния адсорбционного равновесия. С увеличением времени выдерживания в эксикаторах масса образцов не увеличивалась.

ИК-лазерное облучение соединительных тканей

ИК-лазерное облучение проводили с помощью эрбиевого волоконного ИК-лазера ЛС-1.56-5 (“ИРЭ-Полюс”, Россия), $\lambda = 1,56$ мкм, выходная мощность 2 и 3 Вт. Излучение лазера с помощью световода подавали под углом 45° на образцы, закрепленные вертикально в специальном держателе. Расстояние между торцом световода и поверхностью образца составляло 8 мм, диаметр облучаемой зоны – 6 мм. Время лазерного воздействия достигало 10 с, что соответствует времени облучения при лазерной коррекции формы деформированных хрящей [10].

Температуру контролировали дистанционным методом ИК-радиометрии. Сигнал ИК эмиссии собирали с области диаметром 1,5 мм при помощи световода (диаметр 0,7 мм), закрепленного на расстоянии 5 мм перпендикулярно облучаемой поверхности образца. Далее сигнал последовательно передавался на приемник ИК-излучения (CdHgTe-детектор) и предусилитель, оцифровывался и обрабатывался специальной программой. Калибровку сигнала проводили по ИК-излучению воды при температурах $17-92^\circ\text{C}$. Максимальная температура тканей на десятой секунде облучения составляла 51 ± 1 и $71 \pm 2^\circ\text{C}$ при мощности лазера 2 и 3 Вт соответственно.

Спектры КР соединительных тканей

Для получения спектров КР образцы соединительных тканей с известным содержанием воды зажимали между двумя окнами из флюорита с помощью двух резиновых прокладок для предотвращения высыхания или набухания образцов. Эту конструкцию с помощью специального держателя помещали в приставку для получения спектров КР, являющуюся частью прибора “Equinox 55/S” (фирма “Brucker”). Каждый спектр КР записывали с разрешением 4 см^{-1} , усредняли по 150 сканам, затем проводили процедуру Фурье-сглаживания по четырем точкам и нормировали по амплитуде валентных колебаний C–H (2938 см^{-1}).

Отметим, что с увеличением влажности рассеивающая способность образцов соединительных тканей уменьшалась, что приводило к уменьшению величины отношения сигнал/шум.

Результаты и обсуждение

Типичные спектры КР хрящевой ткани и ФСТ, представленные на рис. 1, характерны для биотканей.

Наиболее интенсивные полосы соответствуют валентным колебаниям C–H (2938 см^{-1}), N–H (3320 см^{-1}), O–H ($3150-3500 \text{ см}^{-1}$) и деформационным колебаниям CH_3 (1450 см^{-1}). Хорошо проявляются низкочастотные и высокочастотные составляющие (НЧС и ВЧС) полосы амид I ($1640-1690 \text{ см}^{-1}$), соответствующей валентным колебаниям C=O. Деформационные колебания пептидной группы амид III ($1240-1260 \text{ см}^{-1}$) также выражены достаточно сильно [1–3, 7]. Деформационные колебания пептидной группы амид II проявляются слабо, преимущественно в виде одной или двух полос в районе 1550 см^{-1} .

Основное отличие химического состава ФСТ и хрящевой ткани связано со значительным содержанием протеогликанов в последней [11]. В спектрах КР образцов соединительных тканей это отличие проявляется в области, соответствующей деформационным колебаниям пиранозных циклов $960-1175 \text{ см}^{-1}$. Для хрящевой ткани относительная интенсивность группы полос в этом интервале значительно больше, чем для ФСТ (рис. 1).

Гидратация препаратов интактных тканей

С увеличением содержания воды в препаратах тканей в спектрах КР наблюдался рост интенсивности в области $3150-3600 \text{ см}^{-1}$, соответствующей валентным колебаниям гидроксильных групп. Однако из-за наличия нелинейного фона количественное отнесение этих полос к свободной, связанной и слабосвязанной воде оказалось невозможным.

При повышении влажности происходило систематическое увеличение частоты центральной составляющей полосы амид I ($1669 \text{ см}^{-1} > 1675 \text{ см}^{-1}$) в спектре

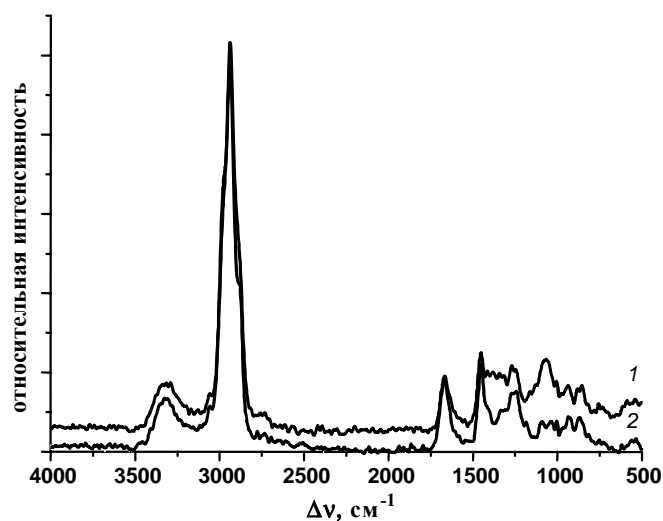


Рис. 1. Спектры КР интактной хрящевой (1) и фиброзной соединительной ткани (2) при относительной влажности 0%

Изменения частот полосы амид I, а также ее НЧС и ВЧС в спектре КР хрящевой ткани с изменением влажности

Влажность, %	ВЧС, см^{-1}	Амид I, см^{-1}	НЧС, см^{-1}
0, *	1684	1669	1646
0, **	1684	1665	1636
0, ***	1682	1665	1644
7, *	1684	1673	1642
7, **	1686	1665	1646
7, ***	1686	1663	1638
44, *	1681	1673	1648
44, **	1694	1671	1653
44, ***	1684	1667	1650
100, *	1681	1675	1646
100, **	1688	1660	1646
100, ***	1681	1661	1646

* Интактный образец; ** образец хрящевой ткани, облученной лазером с выходной мощностью 2 Вт; *** образец хрящевой ткани, облученной лазером с выходной мощностью 3 Вт.

интактной хрящевой ткани (таблица, рис. 2, а). Существование данной систематичности в сдвиге полосы при ее гидратации согласуется с данными о жесткой структуре внеклеточного матрикса хрящевой ткани и о строгой организации системы коллагеновое волокно–полисахаридные цепи. Еще одной особенностью поведения полосы амид I при гидратации хрящевой ткани оказалось выделение НЧС полосы амид I ($\sim 1646 \text{ см}^{-1}$) в самостоятельный пик (рис. 2). Некоторые авторы относят эту полосу к деформационным колебаниям свободной воды (1645 см^{-1}) [5, 6]. Действительно, при низких значениях влажности, когда количество воды настолько мало, что вся она находится в связанном или слабосвязанном состоянии, НЧС выглядит как плечо полосы амид I. При увеличении влажности в хрящевой ткани появляется свободная вода, интенсивность НЧС увеличивается и она уже выглядит как отдельная полоса.

Изменение количества воды в хрящевой ткани приводит к появлению тонкой структуры спектра КР в области колебаний сахарных колец $960\text{--}1175 \text{ см}^{-1}$ (рис. 3).

При увеличении влажности в препаратах хрящевой ткани в первую очередь, по-видимому, гидратируются гликозаминогликаны (ГАГ), содержащие большое число заряженных сульфатных групп. Так, смещение полосы амид I в высокочастотную область наблюдалось для хондроитинсульфата и гиалуроновой кислоты, что было связано с гидратацией групп

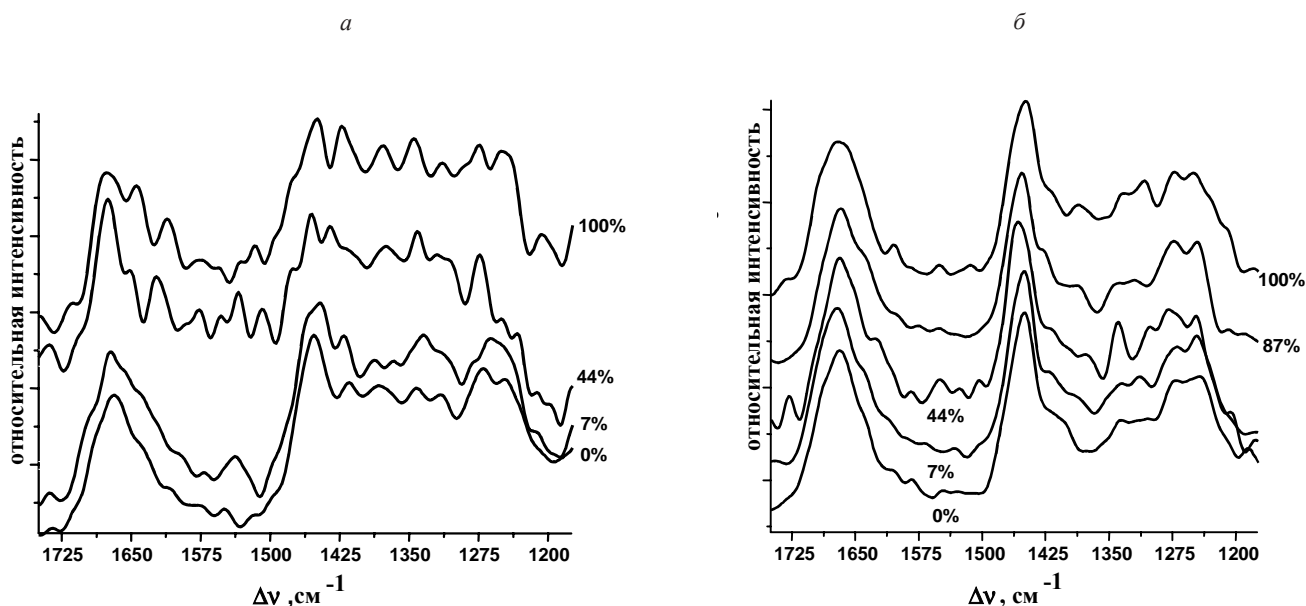


Рис. 2. Изменение спектров КР интактных образцов хрящевой (а) и фиброзной (б) соединительных тканей с изменением влажности

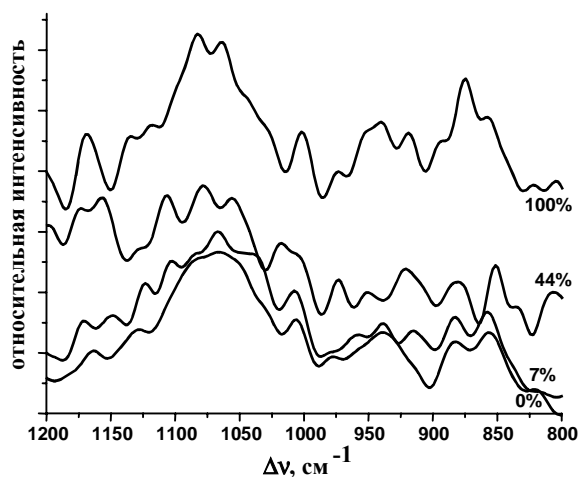


Рис. 3. Изменение спектров КР в области колебаний пиранозных колец интактных образцов хрящевой ткани с изменением влажности

NH-As, связанных с сахарным кольцом ГАГ [12]. Поскольку для ФСТ такая тенденция не наблюдалась, мы отнесли увеличение частоты центральной составляющей полосы амид I к гидратации ГАГ. Это предположение согласуется с наблюдаемым сужением и разделением полосы $960\text{--}1175\text{cm}^{-1}$ при увеличении содержания воды в хрящевой ткани.

При увеличении влажности спектр полосы амид III соединительных тканей в целом не изменялся (рис. 2), представляя собой две перекрывающиеся полосы с частотами 1248 и 1272cm^{-1} .

Влияние лазерной обработки на спектры КР соединительных тканей

Лазерная обработка не приводит к появлению новых полос в спектрах КР, но при этом изменяется форма и соотношение интенсивности некоторых групп полос. Поэтому можно сделать вывод, что при воздействии ИК-лазерного излучения умеренной интенсивности на соединительные ткани в последних не происходит глубокой химической деструкции макромолекул, однако имеет место изменение их надмолекулярной структуры. Этот результат находится в соответствии с данными калориметрических исследований соединительных тканей [4].

Наиболее значительные изменения в спектрах КР облученных образцов фиброзной соединительной ткани наблюдаются в области деформационных колебаний пептидной группы (группа полос амид III). После облучения происходит уменьшение интенсивности этих полос, с увеличением мощности лазерной обработки это уменьшение проявляется все заметнее

(рис. 4). Данная тенденция наблюдается для образцов тканей при любом содержании воды.

Известно, что группа полос амид III наиболее чувствительна к изменению надмолекулярной структуры коллагена и после денатурации этого белка интенсивность и разрешимость полосы амид III уменьшается [1, 2, 5–8]. Таким образом, метод спектроскопии КР позволил зарегистрировать денатурацию коллагена в фиброзной соединительной ткани после лазерной обработки мощностью 3 Вт. Отметим, что данные спектроскопии КР относительно денатурации коллагена согласуются с данными дифференциальной сканирующей калориметрии [4].

В спектре КР хрящевой ткани после ИК-лазерного облучения немного меняется профиль полос пиранозного цикла, по сравнению с платообразным спектром интактной ткани (рис. 5). Интересные изменения происходят в области полосы амид I. После облучения хрящевой ткани в спектрах препаратов исчезает закономерный сдвиг центральной составляющей полосы амид I в область высоких частот при гидратации (табл. 1). На основании этих данных можно предположить, что ИК-лазерная обработка приводит к нарушению жесткой структуры системы коллагеновое волокно–полисахаридные цепи. Косвенным подтверждением этого является уменьшение интенсивности полосы 1646cm^{-1} в облученных образцах. Кроме того, характерный для интактных образцов рост интенсивности этой полосы при гидратации еще сохраняется в образцах, облученных лазером мощностью 2 Вт, а в образцах, облученных лазером мощностью 3 Вт, уже не наблюдается. Эти результаты последо-

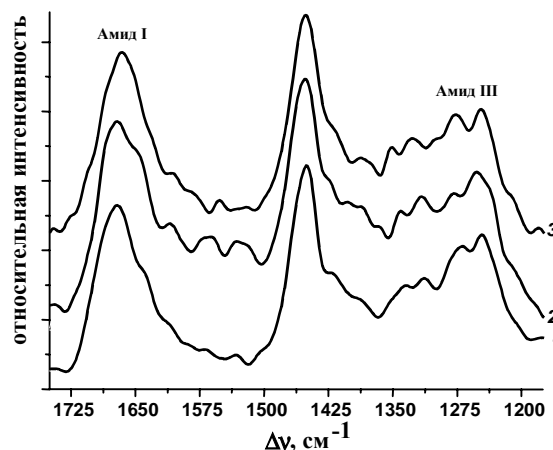


Рис. 4. Спектры КР полос амид I и амид III образцов интактной (1), облученной при 2 и 3 Вт (2 и 3 соответственно) фиброзной соединительной ткани (влажность 7%)

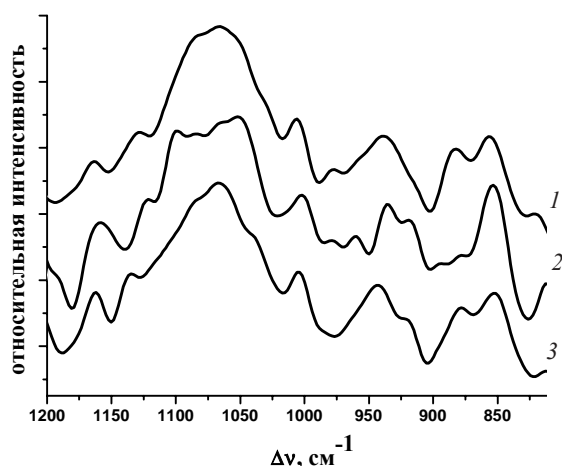


Рис. 5. Спектры КР в области колебаний пиранозных колец образцов интактной (1), облученной при 2 Вт (2) и 3 Вт (3) хрящевой ткани (0% влажности)

вательного изменения надмолекулярной структуры хрящевой ткани при ИК-лазерном воздействии хорошо согласуются с данными о последовательном уменьшении сорбционной емкости в облученных образцах тканей [11].

В спектрах КР препаратов соединительных тканей, подвергнутых лазерному облучению умеренной интенсивности, не наблюдаются новые полосы, однако форма и относительная интенсивность групп полос амид I, амид III и пиранозных колец изменяются. Лазерная обработка соединительных тканей не приводит к химической деструкции биополимеров внеклеточного матрикса, однако имеет место нарушение их надмолекулярной структуры: денатурация коллагена в фиброзной соединительной ткани и нарушение системы коллагеновое волокно–полисахаридные цепи во внеклеточном матриксе хрящевой ткани.

Авторы благодарят РФФИ (гранты 02-02-16246а, 02-02-08058инно) и CRDF (грант RP2-5003-МО-03) за поддержку данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manoharan R., Wang Y., Feld M. S. // *Spectrochimica Acta*. 1996. Part A. **52**. P. 215.
2. Roggan A. *Laser Induced Interstitial Thermotherapy*. Washington, 1995.
3. Sobol E.N., Sviridov A.P., Omelchenko A., Bagratashvili V.N. // *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 2000. **17**. P. 553.
4. Ignatyeva N.Yu., Sobol E.N., Lunin V.V. и др. // *Laser Physics*. 2003. **13**. P. 1.
5. Renugopalakrishnan V., Chandrakasan G., Moore S. // *Macromolecules*. 1989. **22**. P. 4121.
6. Renugopalakrishnan V., Carreira L.A., Collette T.V. // *Z. Naturforsch.* 1998. **53**. С. P. 383.
7. Friess W., Lee G. // *Biomaterials*. 1996. **17**. P. 2289.
8. Рабинович В. А., Хавин З. Я. *Краткий химический справочник*. Л., 1978.
9. Зайцев И. Д., Асеев Г. Г. *Физико-химические свойства бинарных и многокомпонентных растворов неорганических веществ*. М., 1988.
10. Овчинников Ю.М., Свистушкин В.М., Шехтер А.Б., и др. // *Вестн. оториноларингологии*. 2000. **6**. С. 16.
11. Павлова В. Н., Копьева Т. П., Слуцкий Л. И., Павлов Г. Г. *Хрящ*. М., 1988.
12. Camacho N.P., West P., Torzilli P.A. // *Biopolymers (Biospectroscopy)*. 2001. **62**. P. 1.
13. Аверкиев С.В., Игнатъева Н.Ю., Луни В.В., Соболев Э.Н. // *Биофизика*. 2003. **48**. С. 505.

Поступила в редакцию 01.10.04

THE APPLICATION OF RAMAN SPECTROSCOPY FOR CONTROL OF CONNECTIVE TISSUES UNDER IR LASER IRRADIATION

S.V. Averkiev, N.Yu. Ignat'eva, E.N. Sobol, V.V. Lunin, V.N. Bagratashvili

(Division of Physical Chemistry)

Raman spectra of intact and treated by medium intensity IR laser radiation samples of cartilage and fibrous connective tissues (FCT) are presented in this article. It was shown that a main difference between spectra of cartilage and FCT is observed in the region of piranose circles' vibrations (960-1175cm⁻¹). Changes of relative intensities and frequencies of Amid I and III bands at different humidity and after laser treatment are discussed. A difference between Raman spectra of intact and irradiated by laser tissue samples is related to the collagen denaturation and to the change of the conformational state of polysaccharides chains.