

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**«Исследование влияния растворов метиленового синего на оптические  
характеристики кожи»**

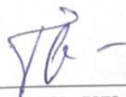
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 4082 группы

направления 12.03.04 "Биотехнические системы и технологии"  
профиль «Медицинская фотоника»  
Института физики  
Петрова Александра Александровича

Научный руководитель

\_\_\_\_\_  
должность, ученая степень, уч. звание

  
\_\_\_\_\_

подпись, дата

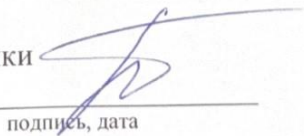
Е.А. Генина

\_\_\_\_\_  
Инициалы Фамилия

Зав. кафедрой оптики и биофотоники

Проф., д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

\_\_\_\_\_  
должность, ученая степень, уч. звание

  
\_\_\_\_\_

подпись, дата

В.В. Тучин

\_\_\_\_\_  
Инициалы Фамилия

Саратов 2026 г.

## Введение

Оптические методы диагностики и лечения занимают центральное место в современной биомедицине, но сталкиваются с основным ограничением, мешающим широкому применению - сильным рассеянием света в биологических тканях, которое происходит из-за неоднородности показателя преломления (ПП) на границах раздела водной среды (ПП  $\approx 1.33$ ) и такими компонентами, как липиды, коллаген и белки (ПП  $\approx 1.43-1.53$ ) [1]. Инфракрасный диапазон, является местом с наименьшим поглощением, где глубина проникновения света в кожу составляет 1-2 мм, что недостаточно для визуализации глубоких структур без инвазивного вмешательства.

Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы является оптическое просветление тканей, которое представляет собой временное изменение оптических свойств биологической ткани путем введения иммерсионных агентов, выравнивающих соотношение водного и белково-липидного комплекса. Основными агентами, используемыми для этой цели, являются: глицерин, пропиленгликоль, диметилсульфоксид и сахара [2,3]. Главная проблема данных агентов заключается в малой эффективности, для достижения значительного просветления требуются высокие концентрации (например, почти чистого глицерина), что приводит к обезвоживанию и сдавливанию тканей.

В работе [4] предложили новый метод, основанный на молекулах с высокой абсорбирующей способностью, способной делать живые ткани прозрачными. Согласно теории Крамерса–Кронига, резкое поглощение в сине-фиолетовой области спектра сопровождается увеличением действительной части показателя преломления на более длинных волнах (красной и ближней инфракрасной). Раствор пищевого красителя тартразина (FD&C Yellow 5) с пиком поглощения 428 нм увеличивает РН водной среды до 1,43–1,47 в диапазоне 600-800 нм, что практически полностью устраняет рассеяние на коже, мышцах и соединительной ткани живых мышц. Авторы продемонстрировали визуализацию перистальтики кишечника, саркомеров и сосудов головного мозга без хирургического удаления покровных тканей.

Подобный метод был применён в офтальмологии. Результатом данного эксперимента стало то, что тартразин может значительно увеличить глубину ОКТ-визуализации склеры свиньи и человека, открывая супрахориоидальное пространство [5]. Аналогичным образом, в работе [6] показано, что клинически одобренный флуоресцеин (пик поглощения 490 нм) также обладает свойствами осветляющего агента, увеличивая сигнал ОКТ от глубоких слоев склеры на 15 дБ.

Метиленовый синий (МС) – хорошо известный катионный краситель, используемый в медицине в качестве антидота, фотосенсибилизатора и контрастного вещества. Его спектральные характеристики хорошо изучены: основной пик поглощения в водном растворе составляет около 664 нм (а также плечо при 610 нм, соответствующее димерным формам) [7,8]. Именно эта область (600-700 нм) находится в пределах "терапевтического окна" и используется в большинстве систем ОКТ.

С точки зрения механизма Крамерса–Кронига, пик поглощения МС при длине волны 664 нм является более длинноволновым, чем у тартразина (428 нм) и флуоресцеина (490 нм). Согласно модели Лоренца, чем ниже резонансная частота, тем эффективнее молекула увеличивает фактический ПП на длинах волн, используемых для визуализации. [4] Таким образом, метиленовый синий потенциально может стать еще более мощным осветляющим средством для ближнего инфракрасного диапазона, чем тартразин или флуоресцеин. Однако, несмотря на это теоретическое преимущество, исследования влияния растворов метиленового синего на оптические характеристики кожи (коэффициенты поглощения и рассеяния, глубину проникновения ОКТ-сигнала) еще не проводились.

Цель и задачи исследования.

Целью данной дипломной работы является экспериментальное исследование влияния водных растворов метиленового синего в различных концентрациях на оптические характеристики кожи *ex vivo* с использованием спектрофотометрии и оптической когерентной томографии.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- 1) Получить значения оптических параметров кожи до и после окрашивания растворами МС (показатель преломления, коэффициент поглощения и транспортный коэффициент рассеяния) в диапазоне поглощения красителя.
- 2) Оценить изменение коэффициента ослабления в процессе диффузии растворов МС в коже.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые систематически исследуется влияние метиленового синего как потенциального просветляющего агента, основанного на механизме Крамерса–Кронига, на оптические свойства кожи. Полученные результаты расширят понимание возможностей использования поглощающих молекул для управления рассеивающими свойствами биологических тканей и могут найти применение при разработке новых подходов к комбинированной оптической диагностике и терапии.

### **Основная часть**

Оптические методы диагностики ограничены сильным рассеянием света в биотканях из-за разницы показателей преломления воды и структурных компонентов (коллаген, липиды). Перспективный подход – оптическое просветление с помощью иммерсионных агентов. Недавно предложен новый механизм: использование сильно поглощающих молекул (например, тартразина), которые по соотношениям Крамерса–Кронига увеличивают показатель преломления среды на длинах волн длиннее пика поглощения.

Цель работы – экспериментально исследовать влияние водных растворов метиленового синего (МС) с концентрациями 0,1% и 0,5% на оптические свойства кожи *ex vivo* (показатель преломления, коэффициенты поглощения и рассеяния, затухание ОКТ-сигнала).

#### Методы и материалы

Использованы 10 образцов кожи лабораторной мыши (очищенных, толщина измерена микрометром).

Приготовлены водные растворы МС 0,1% и 0,5%.

Применялись:

Оптический когерентный томограф (ОКТ, 930 нм) – для оценки показателя

преломления растворов и динамики коэффициента затухания кожи в процессе диффузии (сканирование каждые 5 мин в течение 60 мин).

Спектрофотометр с интегрирующей сферой (400–800 нм) – для измерения диффузного отражения и полного пропускания образцов до и после обработки.

По этим данным с помощью метода обратного удвоения (IAD) рассчитаны коэффициенты поглощения и транспортного рассеяния.

Научная значимость работы заключается в том, что впервые проведено комплексное экспериментальное исследование влияния водных растворов метиленового синего (МС) на оптические характеристики кожи *ex vivo* с использованием ОКТ и спектрофотометрии. Показано, что МС, благодаря резонансному поглощению в красной области спектра, способен выступать в роли агента оптического просветления по механизму Крамерса–Кронига, увеличивая показатель преломления и снижая рассеяние на длинноволновых участках. Впервые выявлена временная конкуренция между поглощением красителя и иммерсионным просветлением в процессе диффузии, а также установлены спектральные закономерности изменения коэффициентов поглощения и транспортного рассеяния в зависимости от концентрации раствора. Эти результаты расширяют представления о возможностях управления оптическими свойствами биотканей с помощью поглощающих молекул и открывают перспективы для разработки комбинированных диагностических и терапевтических методик.

### Результаты и обсуждение

По результатам обработки ОКТ-изображений были получены следующие значения показателя преломления ( $\eta$ ) для растворов МС двух концентраций.

Таблица 1. — Полученные данные

Растворы	$L_p$ (пиксели)	$L_g$ (пиксели)
Дистиллированная вода	93.022	123.037
0,1%	81.056	113.018

0,5%	90.05	126.099
------	-------	---------

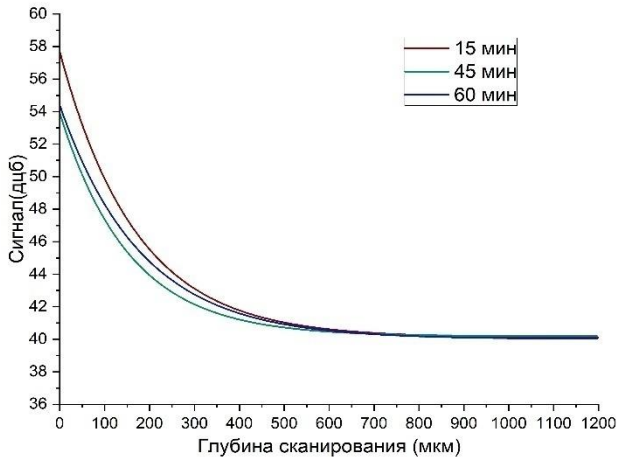
Таблица 2. — Рассчитанных показателей преломления растворов

Растворы	$\eta$ – показатель преломления
Дистиллированная вода	1.3225
0,1%	1.3943
0,5%	1.4003

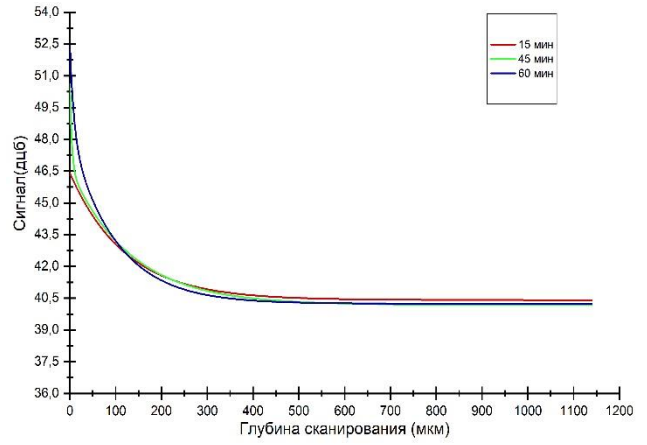
Сравнение показателя преломления (ПП), рассчитанного по данным ОКТ-сканов, с табличным значением 1,3325 [9] позволяет заключить, что данный метод приводит к систематическому занижению ПП. Это отклонение обусловлено субъективным (ручным) выбором участка, соответствующего внутренней области кюветы.

Полученные значения показывают, что с увеличением концентрации МС с 0,1% до 0,5% показатель преломления возрастает с 1,3225 до 1,4003, что соответствует ожидаемой зависимости: более концентрированные растворы имеют более высокую оптическую плотность и больший показатель преломления.

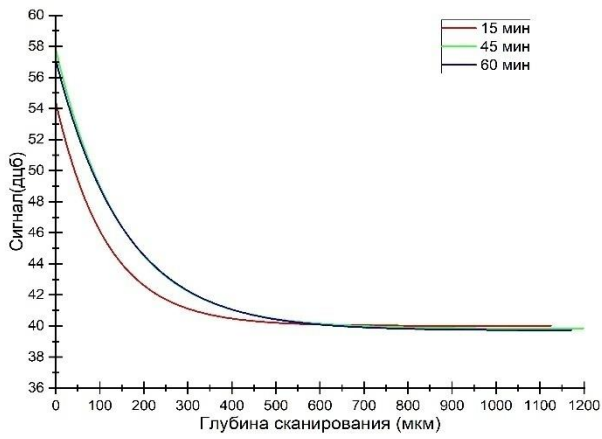
В ходе эксперимента оценивалось изменение коэффициента затухания ( $\mu_t$ ) образцов биоткани при нанесении растворов МС двух концентраций: 0,1% и 0,5%. Для каждого образца были получены аппроксимированные зависимости интенсивности ОКТ-сигнала от глубины сканирования в моменты времени 15, 45 и 60 минут (рисунок 1). На основе этих кривых анализировалась динамика сигнала на фиксированной глубине 300 мкм (рисунок 2).



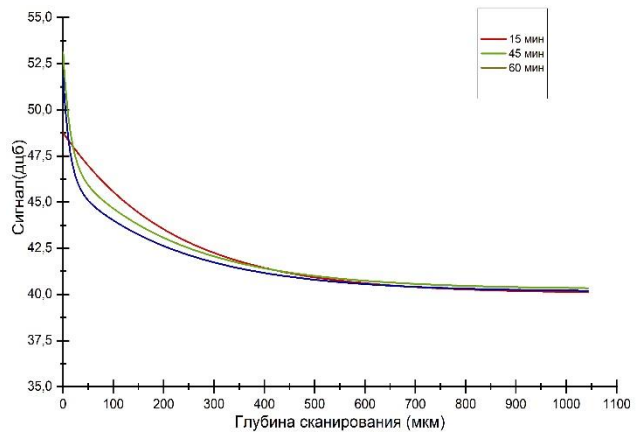
А



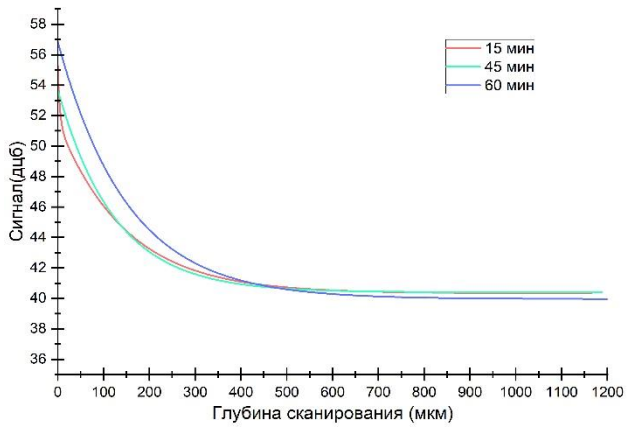
Б



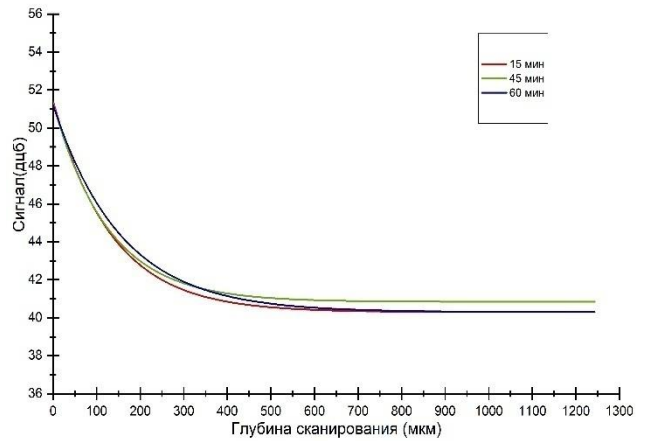
В



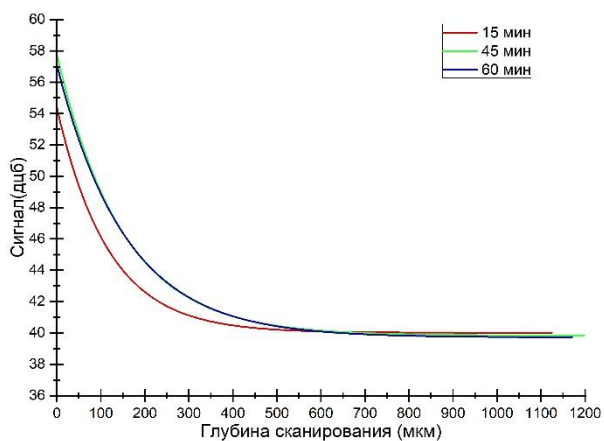
Г



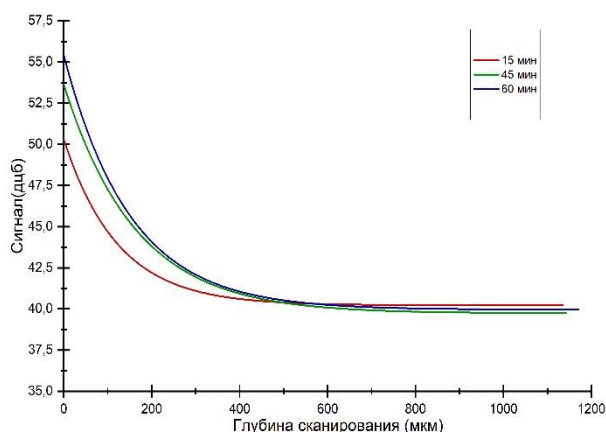
Д



Е



Ё



Ж

Рисунок 1. — Аппроксимированная зависимость интенсивности сигнала от глубины сканирования образца, находившегося в растворе в течение 15, 45 и 60 минут. Образцы, находившиеся в 0,1% растворе МС (А-Г), в 0,5% растворе МС (Д-Ж).

По рисунку 2 (А) можно заметить, что в течении 15 минут наблюдается увеличение сигнала, этот эффект объясняется тем что 0,1% водный раствор метиленового синего проникает в кожу и замещает воду тем самым влияя на поглощение и показатель преломления за счёт просветления образца, просветление доминирует над поглощением из-за чего наблюдается незначительный рост сигнала. На отрезке 15-30 мин наблюдается снижение сигнала из-за того, что раствор метиленового синего полностью заменил воду в образце в следствии чего повышается поглощение. На отрезке 30-60 минут образец продолжает просветляться в связи с чем коэффициент ослабления уменьшается. [10]

Рисунок 2 (Б) показывает, что в интервале 0-30 минут наблюдается спад сигнала. Раствор 0,5% МС обладает большим поглощением за счёт большего содержания метиленового синего, что перекрывает просветляющий эффект. На отрезке 30-60 минут просветление начинает доминировать над поглощением в связи с чем коэффициент ослабления постепенно уменьшается.

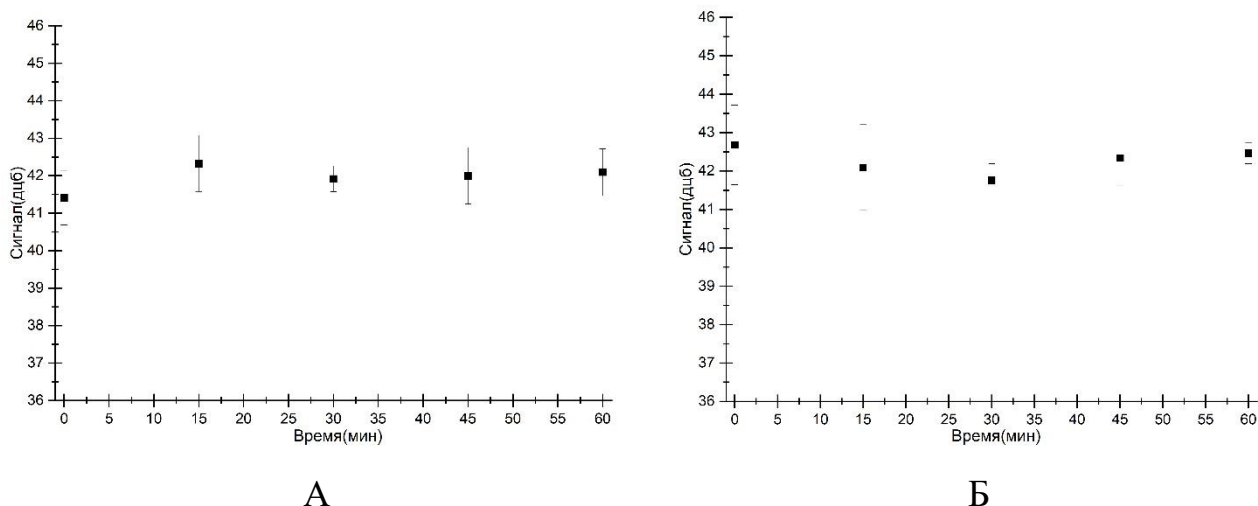


Рисунок 2. — График усреднённой временной зависимости интенсивности сигнала на глубине 300 мкм для образцов, погружённых в раствор МС. – А) 0,1%, Б) 0,5%

В обоих случаях увеличение сигнала после 30 минут нанесения раствора свидетельствует о длительном просветляющем действии метиленового синего, которое становится преобладающим при достаточном времени диффузии. Более концентрированный раствор характеризуется более выраженным начальным поглощением, что задерживает наступление фазы просветления.

Из представленных выше данных (рисунок 2) следует, что помимо увеличения поглощения образца происходит просветление, о чём свидетельствует постепенное возрастание сигнала на интервале времени от 30 до 60 минут.

На рисунке 3 (А-Б) наблюдаются аналогичные процессы на одинаковых интервалах. Выраженный рост коэффициента затухания в интервале 0-30 минут обусловлен диффузией раствора в ткань и преобладанием поглощения метиленового синего над его просветляющими свойствами. На временном промежутке от 30 до 60 минут фиксируется смена тенденции: доминирование поглощения сменяется преобладанием просветления. Выраженный пик (рисунок 3. А) в интервале 45-60 мин связан неравномерностью проникновения раствора в дерму образца. [11]

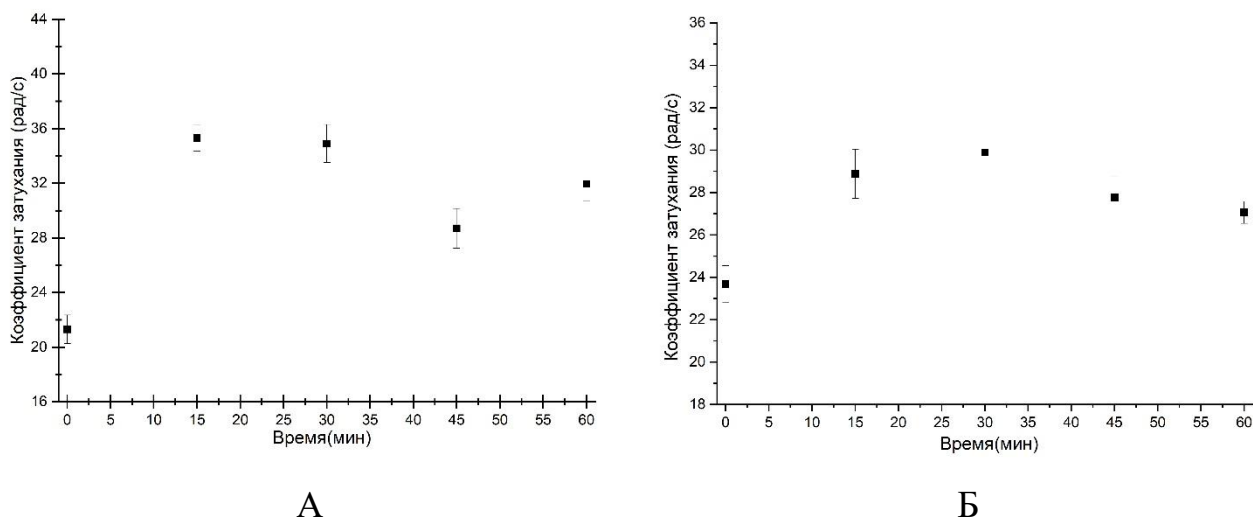
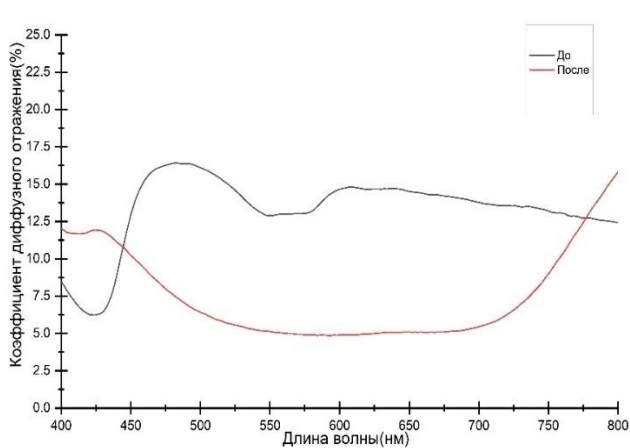
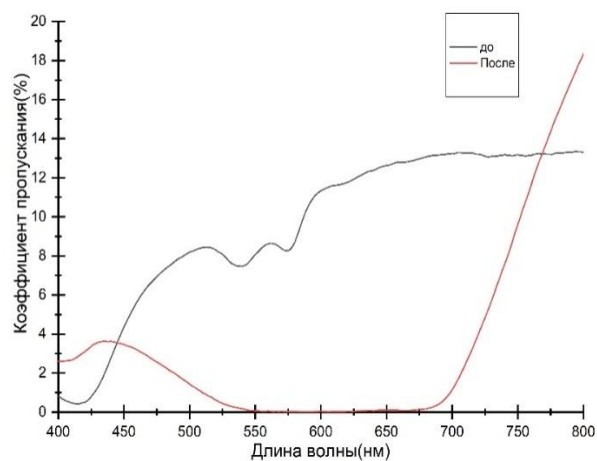


Рисунок 3. — Временная зависимость коэффициента затухания – А) Раствор 0,1% МС, Б) Раствор 0,5% МС

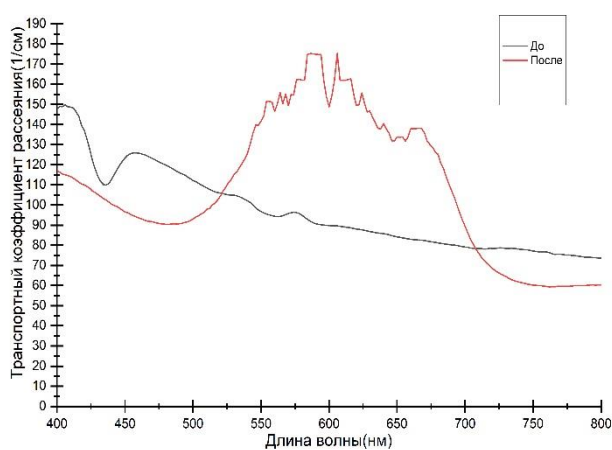
Как показано на рисунке 4 (А), нанесение 0,1% раствора МС приводит к снижению диффузного отражения в диапазоне 450–700 нм с 14–16% до 4,8–5,5%, а вне этой полосы (400–425 нм и 750–800 нм) отражение возрастает, что указывает на иммерсионный эффект в областях слабого поглощения красителя. Согласно рисунку 14 (Б), в полосе поглощения МС (500–700 нм) полное пропускание после обработки падает до 0,1–0,25% с исходных 7–13%, однако в УФ-синей области (400–450 нм) пропускание возрастает с 0,2–1,5% до 2,8–4,0%, что может быть следствием снижения рассеяния, иммерсии на этих длинах волн, где поглощение красителя мало. Транспортного рассеяния (рисунок 4. В), наблюдает разнонаправленные изменения в зависимости от длины волны: в синей области (400–500 нм) коэффициент снижается, что соответствует классическому иммерсионному эффекту - выравнивание показателей преломления; в красной области (550–675 нм) рассеяние возрастает, что объясняется набуханием ткани и агрегацией молекул красителя; на длинах волн >700 нм наблюдается снижение рассеяния. Снижение коэффициента поглощения (рисунок 4. Г) показывает, что на коротких волнах (400–450 нм) после нанесения раствора, происходит частичное просветление ткани из-за иммерсии, которое перекрывает собственное поглощение кожи и красителя, тогда как в основной полосе (500–700 нм) коэффициент поглощения резко возрастает.



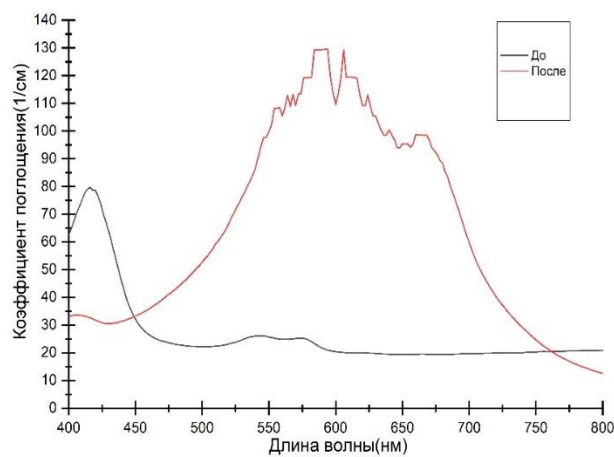
А



Б



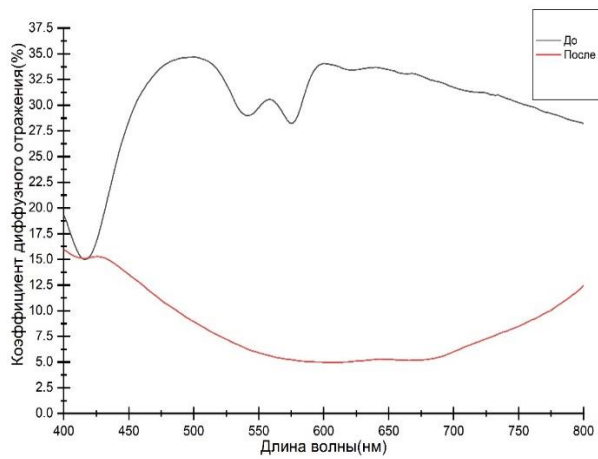
В



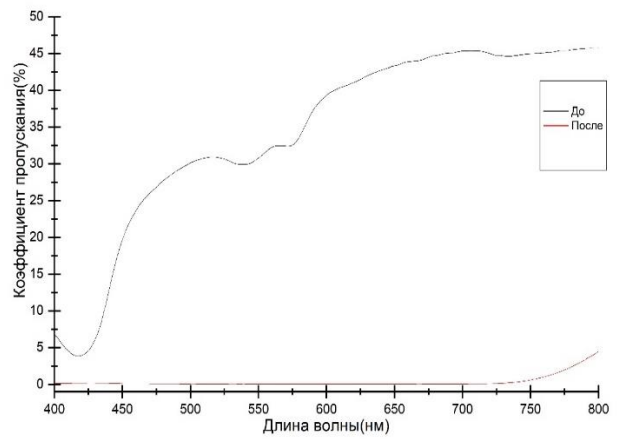
Г

Рисунок 4. — Зависимости оптических коэффициентов от длины волны образца, взаимодействующего с раствором 0,1% МС. А) Диффузное отражение, Б) Полное пропускание, В) Транспортное рассеяние, Г) Поглощение

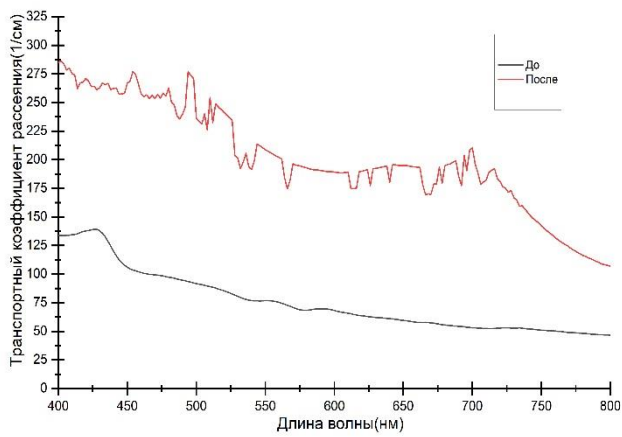
Как показано на рисунке 5 (А), после нанесения 0,5% раствора МС диффузное отражение резко снижается в диапазоне 450–700 нм — с 30–34% до 5–6%. Минимум (около 5%) достигается при 600–675 нм, что соответствует полосе поглощения красителя. Вне этой полосы (400–425 нм и 750–800 нм) отражение возрастает, что указывает на проявление иммерсионного эффекта. Коэффициент пропускания резко падает (рисунок 5. Б) и кожа становится практически непрозрачной в полосе поглощения МС; что подтверждает сильное поглощение красителя. Коэффициента рассеяния (рисунок 5. В) резко увеличивается после нанесения раствора, что объясняется набуханием образца. Поглощение (рисунок 5. Г) показывает, что характерная полоса поглощения МС достигается в диапазоне 500–700 нм.



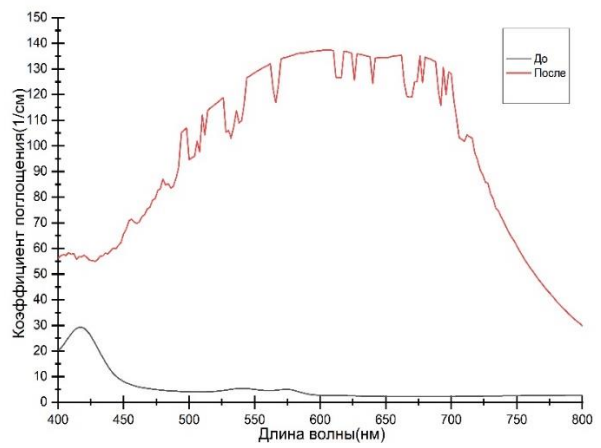
А



Б



В



Г

Рисунок 5. — Зависимости оптических коэффициентов от длины волны образца, взаимодействующего с раствором 0,5% МС. А) Диффузное отражение, Б) Полное пропускание, В) Транспортное рассеяние, Г) Поглощение

## Заключение

В ходе выполнения работы была проведена оценка воздействия водных растворов метиленового синего (МС) с концентрациями 0,1% и 0,5% на оптические свойства кожи лабораторной мыши *ex vivo*. Используются методы оптической когерентной томографии (ОКТ) и спектрофотометрии с интегрирующей сферой в диапазоне длин волн 400–800 нм. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы.

Полученные значения показывают, что с увеличением концентрации МС с 0% до 0,5% показатель преломления возрастает с 1,3225 до 1,4003, что соответствует ожидаемой зависимости: более концентрированные растворы имеют более высокую оптическую плотность и больший показатель преломления.

Анализ временной динамики ОКТ-сигнала (рисунок 12) показал, что воздействие водных растворов метиленового синего на кожу определяется конкуренцией двух процессов: иммерсионного просветления (снижение рассеяния, рост сигнала) и поглощения света красителем (ослабление сигнала). При концентрации 0,1% в первые 15 мин доминирует просветление (сигнал растёт), затем до 30 мин – поглощение (сигнал падает), а после 30 мин – повторное просветление. Для 0,5% раствора сильное поглощение преобладает в течение первых 30 мин (сигнал непрерывно снижается), и только после 30 мин просветление начинает доминировать, вызывая рост сигнала. Таким образом, оптический отклик кожи существенно зависит от концентрации красителя и времени инкубации, что необходимо учитывать при выборе режимов облучения в фотодинамической терапии.

На основе анализа данных полученных для двух концентраций метиленового синего (0,1% и 0,5%) установлено, что в интервале 0–30 минут коэффициент затухания возрастает за счёт диффузии красителя в ткань и преобладания поглощения над просветлением. В интервале 30–60 минут происходит смена тенденции: доминирование поглощения сменяется просветлением. Однако при концентрации 0,1% на участке 45–60 минут наблюдается дополнительный пик,

обусловленный неравномерностью проникновения раствора в дерму, тогда как для 0,5% кривая спадает монотонно. Таким образом, метиленовый синий способен влиять на коэффициент затухания, снижая его при длительном воздействии на образец.

Анализ зависимостей оптических коэффициентов показал, что для обеих исследуемых концентраций в спектральном диапазоне поглощения красителя (450–700 нм) диффузное отражение существенно уменьшается: при концентрации 0,5% — с 30–34% до 5–6%, при концентрации 0,1% — с 14–16% до 4,8–5,5%. Вне данного диапазона (400–425 нм и 750–800 нм) наблюдается возрастание отражения, обусловленное иммерсионным эффектом (выравниванием показателей преломления). Полное пропускание в области 500–700 нм снижается до 0,1–0,25%, что подтверждает высокую поглощающую способность красителя. При этом для 0,1% раствора в УФ-синей области (400–450 нм) пропускание возрастает с 0,2–1,5% до 2,8–4,0% вследствие иммерсионного уменьшения рассеяния на длинах волн со слабым поглощением красителя.

Для 0,5% раствора фиксируется резкое увеличение транспортного рассеяния и поглощения по всей области (400–800 нм), интерпретируемое как результат набухания образца.

Для 0,1% раствора изменения транспортного рассеяния носят разнонаправленный характер: в синей области (400–500 нм) коэффициент рассеяния снижается (иммерсионный механизм), в красной области (550–675 нм) — возрастает (агрегация молекул красителя и набухание ткани), а при длинах волн свыше 700 нм вновь наблюдается снижение рассеяния (иммерсия). Коэффициент поглощения на коротких волнах (400–450 нм) уменьшается, что указывает на частичное просветление ткани вследствие иммерсионного эффекта, перекрывающего собственное поглощение кожи и красителя. В основной полосе поглощения (500–700 нм) коэффициент поглощения резко возрастает, формируя характерный пик метиленового синего.

## Список литературы

1. Tuchin V.V. Optical Clearing of Tissues and Blood. Bellingham : SPIE Press, 2005.
2. Tuchin V.V., Yu T., Zhong X., et al. Delivery and kinetics of immersion optical clearing agents in tissues // Advanced Drug Delivery Reviews. 2024. DOI: 10.1016/j.addr.2024.115470.
3. Genina E.A. Traditional and innovative optical clearing agents // Handbook of Tissue Optical Clearing. Boca Raton : CRC Press, 2022.
4. Ou Z., Duh Y.S., Rommelfanger N.J., et al. Achieving optical transparency in live animals with absorbing molecules // Science. 2024. Vol. 385. Article eadm6869.
5. Narawane A., Trout R., Viehland C., et al. Optical clearing with tartrazine enables deep transscleral imaging with optical coherence tomography // Journal of Biomedical Optics. 2024. Vol. 29. No. 12. P. 120501.
6. Trout R.M., Narawane A., Viehland C., et al. Fluorescein as an optical clearing agent for improved tissue imaging depth // International Journal of Translational Medicine. 2025. Vol. 6. P. 7.
7. Fernández-Pérez A., Marbán G. Visible light spectroscopic analysis of Methylene Blue in water // Journal of Applied Spectroscopy. 2022. Vol. 88. No. 6. P. 1284–1290.
8. Bueno L.A., et al. Molecular properties of methylene blue and its derivatives // Environmental Chemistry Letters. 2025. Vol. 23. P. 1403–1424.
9. Руководство по оптической когерентной томографии / под ред. Н. Д. Гладковой, Н. М. Шаховой, А. М. Сергеева. – Москва : ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 296 с. – ISBN 978-5-9221-0718-3 (в пер.).
10. Измерение оптических параметров биотканей с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой : лаб. работа №2. – 2017. – 17 с.
11. Генина, Э. А. Методы медицинской биофизики : учеб.-метод. пособие / Э. А. Генина. – Саратов : Издательство Саратовского университета, 2025. – 66 с. : ил.