

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Кинетика оптического просветления кожи ex vivo раствором глицерина
различной концентрации**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 434 группы

направления 03.03.02 ФИЗИКА

физического факультета

Разделкиной Юлии Павловны

Научный руководитель

ассистент

Д.К. Тучина

Зав. кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

В.В. Тучин

Саратов 2016год

Введение

Сохраняется проблема ограничения применения оптических методов диагностики и лечения в медицине. Проблема связана с тем, что пространственное разрешение и глубина зондирования биотканей излучением видимого и ближнего ИК спектральных диапазонов ограничены рассеивающей способностью биологических тканей[1].

Решение проблемы сводится к изменению рассеивающих характеристик биотканей. Для этого могут использоваться иммерсионные жидкости, которые путем проникновения в биоткань выравнивают показатели преломления компонентов ткани, тем самым увеличивая проникновение света в биоткань. Помимо этого иммерсионные жидкости вызывают осмотическую дегидратацию ткани, в результате которой также уменьшается разница между показателями преломления компонентов ткани[2].

В качестве иммерсионных жидкостей используются различные растворы, обладающие необходимыми свойствами[1]. Широко используются растворы глицерина различных концентраций [2].

В силу вышеизложенного целью работы является исследование оптических и диффузионных характеристик ткани кожи при воздействии на нее растворов глицерина разной концентрации.

Материалы и методы

1.1 Объекты исследований и оптические просветляющие агенты

В качестве образцов в экспериментальных исследованиях использовали кожу белых беспородных лабораторных крыс.

Волосистой покров с кожи убирали с помощью крема для депиляции «Velvet» (ООО «Стела», Россия). Вырезался образец кожи размером приблизительно $10 \times 15 \text{ мм}^2$, после чего аккуратно отделяли подкожный жир от кожи, поскольку он является препятствием для проникновения гидрофильных веществ в дерму. Далее измеряли толщину образца микрометром, для этого помещали его между двумя стеклами и производили замеры в нескольких точках. Погрешность каждого измерения составляла $\pm 5 \text{ мкм}$. Полученные данные усреднялись. На электронных весах (SCIENTECH, SA210, USA), производилось измерение веса образца с точностью $\pm 1 \text{ мг}$.

В качестве иммерсионных жидкостей использовались водный 40%- и 80%-раствор глицерина. Показатели преломления растворов глицерина измерялись с помощью рефрактометра НРФ-454. Данные о вязкости, плотности и показателях преломления 40%-раствора и 80%-раствора глицерина представлены в таблице 2 [3].

Таблица 3. Данные плотности, вязкости и показателя преломления растворов глицерина разных концентраций.

Концентрация раствора глицерина	40% - раствор	80% - раствор
Плотность (кг/м^3)	1.099	1.208
Вязкость ($\text{мм}^2/\text{с}$)	3.72	60.1
Показатель преломления	1.384	1.443

1.2 Измерение коллимированного пропускания образцов кожи во время оптического просветления

Образец кожи закреплялся на специальной рамке размером $1 \times 1.5 \text{ см}^2$ и помещался в кювету с иммерсионным агентом. Кювета устанавливалась между двумя волоконно-оптическими кабелями (P400-1-UV-VIS, Ocean Optics, США) с внутренним диаметром 400 мкм. Используется коллимированное пропускание: одно волокно создает источник света, который служит для доставки излучения к образцу; далее выделяется узкий пучок прошедший через образец, а другое волокно служит для сбора прошедшего излучения. Для создания коллимированного пучка света на

торцах волокон закреплялись коллиматоры 74-ACR (Ocean Optics, США). Измерение спектров пропускания производилось с использованием многоканального спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) в спектральном диапазоне 400-1000 нм.

Схема экспериментальной установки показана на рисунке 3. Источником излучения служила галогенная лампа HL2000 (Ocean Optics, США). Измерения коллимированного пропускания производились каждые 5 минут в течение 1.5-2 часов. Перед началом измерений регистрировался сигнал сравнения от кюветы, заполненной иммерсионным агентом, с рамкой без образца кожи. Все измерения проводились при комнатной температуре (~20°C).

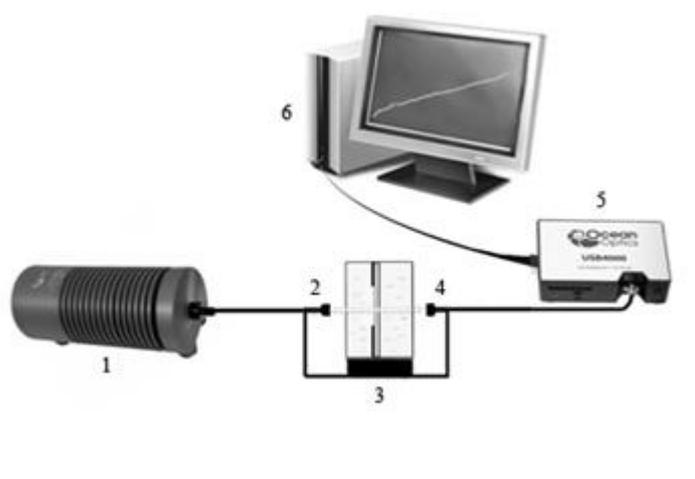


Рис1. Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца кожи: 1 - источник света HL-2000; 2, 4 - оптические волокна с коллиматорами; 3 - кювета с зафиксированным в рамке образцом; 5 - спектрометр USB-4000-Vis-NIR; 6 - персональный компьютер [4].

1.3 Расчет эффективности просветления кожи

В настоящем исследовании происходит процесс односторонней диффузии.

Проникновение иммерсионной жидкости происходит только с внутренней стороны ткани кожи, это связано с защитными свойствами эпидермиса.

Автор статьи [2] разработал алгоритм вычисления эффективности диффузии для данного процесса.

Для вычисления эффективности просветления используется формула:

$$T(t) = \frac{T(t) - T(t = 0)}{T(t = 0)} \quad (1.1)$$

где $T(t=0)$ – коэффициент пропускания в начальный момент времени,
 $T(t)$ – коэффициент пропускания в момент времени t [6].

1.4 Расчет коэффициента диффузии глицерина в коже *ex vivo*

При решении одномерной задачи диффузии, используется уравнение:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (2.1)$$

представляющее собой второй закон Фика, где

$C(x,t)$ – концентрация иммерсионного агента в коже;

D – коэффициент диффузии раствора, см²/сек;

t – время, в течении которого происходит процесс диффузии, сек;

x – пространственная координата по толщине образца биоткани, см. [1]

Так как в экспериментах объем иммерсионной жидкости значительно превышает объем образца кожи, то граничные условия имеют вид:

$$C(0,t) = C_0 \quad \text{и} \quad \frac{\partial C(l,t)}{\partial x} = 0 \quad (2.2)$$

где C_0 – концентрация в кювете, г/мл;

l – толщина образца биоткани, см.

Второе граничное условие отражает тот факт, что диффузия иммерсионной жидкости внутрь образца кожи происходит только с одной стороны образца, т.е. со стороны дермы. [2]

Начальные условия отражают отсутствие иммерсионного агента во всех внутренних точках образца биоткани до его инкубации в раствор, т.е.

$$C(x,0) = 0. \quad (2.3)$$

Решение уравнения (2.1) учетом начальных (2.3) и граничных (2.2) условий имеет вид:

$$C(x,t) = C_0 \left(1 - \sum_{i=0}^{\infty} \frac{4}{\pi(2i+1)} \sin\left(\frac{(2i+1)\pi x}{2l}\right) \exp\left(-\frac{(2i+1)^2 D \pi^2 t}{4l^2}\right) \right) \quad (2.4)$$

Средняя концентрация иммерсионного раствора внутри образца биоткани $C(t)$ в каждый момент времени определяется выражением:

$$C(t) = C_0 \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \exp\left(-\frac{(2i+1)^2 t \pi^2 D}{4l^2}\right) \right) \quad (2.5)$$

В упрощенном виде формула (2.5) выглядит так :

$$C(t) \approx C_0 \left(1 - \exp(-t\pi^2 D/l^2) \right). \quad (2.6)$$

В уравнении (2.6) время диффузии τ можно определить как:

$$\tau = \frac{l^2}{\pi^2 D} \quad (2.7)$$

откуда окончательная формула для нахождения коэффициента диффузии:

$$D = \frac{l^2}{\pi\tau} \quad (2.8)$$

Для определения времени диффузии производилась минимизация функции:

$$f(A, \tau) = \sum_{i=1}^{N_t} (A(1 - \exp(-t_i / \tau)) - T(t_i))^2 \quad (2.9)$$

где N_t - общее количество экспериментальных точек, полученное при регистрации динамики просветления биоткани;

$T(t_i)$ - экспериментально измеренное значение степени просветления в каждый момент времени t [5]. В результате минимизации функции (2.9) получено значения параметров A и τ , которые обеспечивали бы наилучшее согласование экспериментальных данных с предложенной моделью [6].

Начальные значения параметров A и τ оценивались из графика зависимости пропускания образца от времени путем аппроксимации зависимости уравнением:

$$\exp(-t/\tau) = 1 - T(t)/A \quad (2.10)$$

2. Результаты и обсуждение

2.1 Просветление кожи *ex vivo* с помощью 40%-раствора глицерина

На рисунке 4 представлены типичные спектры коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 40%-раствор глицерина, измеренные в различные моменты времени. В начальный момент времени кожа представляет собой мало прозрачную для оптического излучения среду. Из графика видно, что наблюдается значительное увеличение коэффициента пропускания кожи при его иммерсии в растворе, что обусловлено проникновением в биоткань иммерсионной жидкости и выхода из неё воды, в результате чего происходит выравнивание показателей преломления коллагеновых волокон и окружающей среды.

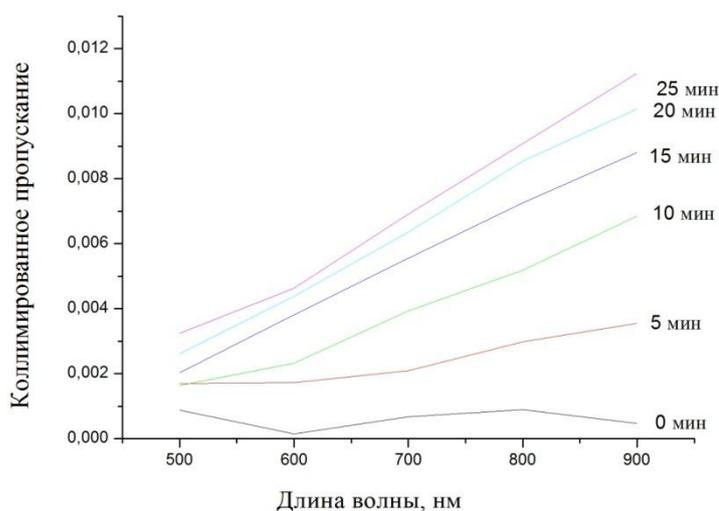


Рис 4. Спектры коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 40%-раствор глицерина, измеренные в разные моменты времени

На рисунке 5 представлена кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 40%-раствор глицерина. Из рисунка 5 видно, что оптическое просветление образца кожи в 40%-растворе глицерина продолжается в течение получаса, после чего процесс завершается.

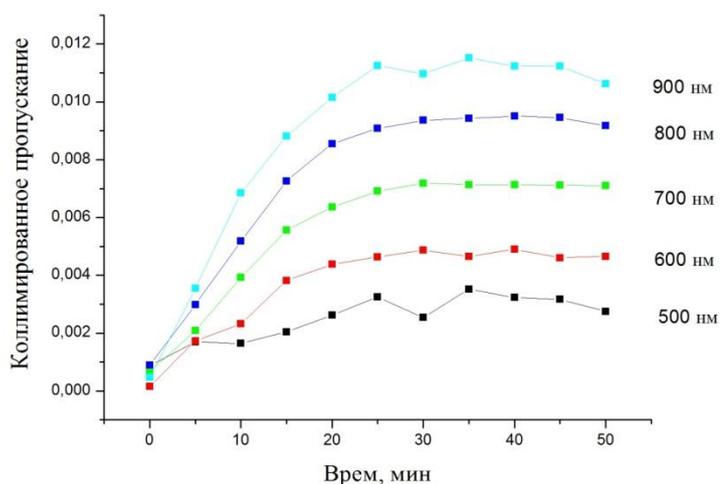


Рис 5. Кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 40%-раствор глицерина

В то же время, с проникновением в биоткань иммерсионной жидкости происходит набухание образца. Значения толщины и веса каждого образца до и после оптического просветления, а также средние значения толщин и веса образцов представлены в таблице 5. Можно видеть, что после иммерсии кожи в растворе глицерина увеличилась толщина образцов. Несмотря на поперечное набухание образцов, не происходит снижения оптического пропускания образца.

Таблица 5. Значения толщины и веса образца до и после эксперимента при 40%-растворе глицерина

Образец №	Толщина начальная, мм	Толщина конечная, мм	Вес начальный, г	Вес конечный, г
1	0,67	0,89	0,353	0,339
2	0,82	0,90	0,264	0,275
3	0,61	0,58	0,326	0,280
4	0,47	0,50	0,314	0,269

5	0,66	0,83	0,424	0,359
6	0,59	0,62	0,559	0,477
7	0,46	0,80	0,739	0,791
8	1,05	0,97	0,728	0,764
9	0,79	0,84	0,664	0,639
Средние значения	0,68±0,18	0,77±0,16	0,485±0,18	0,465±0,210

В таблице 6 представлены рассчитанные значения коэффициента (D), времени диффузии (τ) глицерина в коже и их среднеквадратические отклонения ($sd(D)$, $sd(\tau)$) при использовании 40%-раствора глицерина. Среднее значения коэффициента диффузии глицерина в коже при использовании 40%-раствора глицерина было получено равным $(9,28 \pm 1,59) \times 10^{-7}$ см²/сек.

Таблица 6. Значения коэффициента, времени диффузии глицерина в коже и их среднеквадратические отклонения при использовании 40%-раствора глицерина

Образец	D, см²/сек	sd (D)	τ, мин	sd (τ)
1	$7,86 \times 10^{-7}$	$1,31 \times 10^{-9}$	30	0.06
2	$7,87 \times 10^{-7}$	$2,24 \times 10^{-9}$	59	0.17
3	$9,24 \times 10^{-7}$	$3,79 \times 10^{-9}$	24	0.15
4	$1,17 \times 10^{-6}$	$1,93 \times 10^{-9}$	19	0.04
5	$1,01 \times 10^{-6}$	$9,17 \times 10^{-10}$	62	0.07
6	$6,97 \times 10^{-6}$	$4,74 \times 10^{-10}$	57	0.03
7	$1,02 \times 10^{-6}$	$5,08 \times 10^{-9}$	39	0.46
8	$1,04 \times 10^{-6}$	$2,04 \times 10^{-9}$	78	0.04
Средние значения	$(9,28 \pm 1,59) \times 10^{-7}$		46 ± 20	

В таблице 7 отображена эффективность оптического просветления кожи при иммерсии в 40%-растворе глицерина в диапазонах длин волн: 500-600 нм, 600-700 нм и 700-900 нм.

Таблица 7. Эффективность пропускания кожи при иммерсии в 40%-растворе глицерина на длине волн: 500-600 нм, 600-700 нм и 700-900 нм

Образец №	500-600 нм	600-700 нм	700-900 нм
1	0,015	0,020	0,029
2	0,012	0,010	0,012
3	0,006	0,007	0,008
4	0,050	0,068	0,097
5	0,036	0,053	0,077
6	0,014	0,014	0,016
7	0,007	0,008	0,010
8	0,007	0,006	0,008
9	0,007	0,004	0,007
Средние значения	0,017±0,015	0,021±0,023	0,029±0,033

Из полученных данных видно, что в течение получаса эффективность оптического пропускания увеличивается с увеличением длины волны, это связано с большим рассеянием света в коротковолновой области спектра.

3.2 Оптическое просветление кожи *ex vivo* с помощью 80%-раствора глицерина

На рисунке 6 представлены типичные спектры коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 80%-раствор глицерина, измеренные в различные моменты времени.

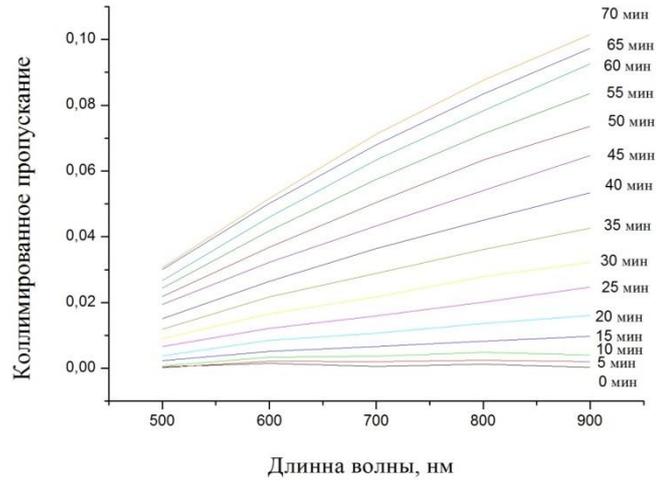


Рис 6. Спектры коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 80%-раствор глицерина

Из рисунка 7 видно, что оптическое просветление образца кожи в 80%-растворе глицерина продолжается чуть более часа, после чего процесс оптического просветления завершается. Происходит дегидратация ткани, что приводит к росту показателя преломления внутритканевой жидкости, а, следовательно, выравниванию показателей преломления компонентов ткани и окружающей их среды.

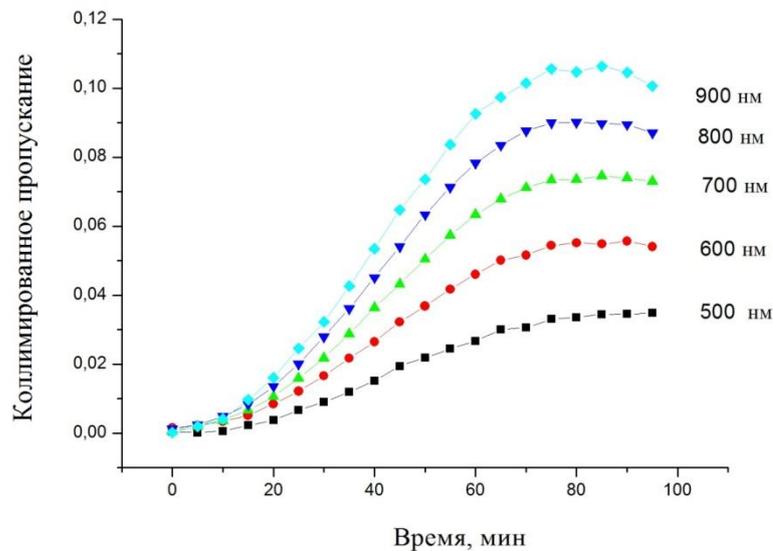


Рис 7. Кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в 80%-раствор глицерина.

При сравнении представленной кинетики изменения коллимированного пропускания кожи 40%- и 80%-раствором глицерина видно, что процесс просветления в случае применения 40%-раствора более быстрый, но менее эффективный. Это связано с тем, что у данного раствора не высокая вязкость (3,72) по сравнению с 80%-раствором глицерина (60,1), диффузия агента внутрь образца кожи происходит быстрее.

Значения толщины и веса до и после эксперимента представлены в таблице 8. Проникновение в биоткань иммерсионной жидкости вызывает поперечное набухание образца - растет его толщина, что в свою очередь приводит к небольшому уменьшению коллимированного пропускания кожи.

Из весовых измерений следует, что при взаимодействии кожи с 80%-раствором глицерина происходит более сильная дегидратация ткани по сравнению со случаем использования 40%-раствора глицерина, обусловленная возникновением более сильного осмотического давления, а также гигроскопичностью глицерина.

Таблица 8. Измерения толщины образца до и после эксперимента при 80%-растворе глицерина

Образец №	Толщина начальная, мм	Толщина конечная, мм	Вес начальный, г	Вес конечный, г
1	0,95	0,71	0,335	0,301
2	0,71	0,64	0,397	0,278
3	0,61	0,63	0,124	0,284
4	0,55	0,67	0,291	0,183
5	0,54	0,69	0,443	0,352
6	0,89	0,78	0,427	0,418
7	0,41	0,78	0,335	0,307
8	0,48	0,67	0,413	0,322

9	0,59	0,95	0,321	0,299
Средние значения	0,63±0,013	0,72±0,100	0,343±0,097	0,305±0,062

В таблице 9 представлены рассчитанные значения коэффициента диффузии (D) и времени диффузии (τ) агента в коже, и их среднеквадратические отклонения при воздействии 80%-раствора глицерина на кожу. Среднее значение коэффициента диффузии глицерина в коже при использовании 80%-раствора глицерина было получено равным: $(8,83 \pm 7,47) \times 10^{-7}$ см²/сек.

Таблица 9. Значения коэффициента, времени диффузии глицерина в коже и их среднеквадратические отклонения при использовании 40%-раствора глицерина

Образец	D , см ² /сек	sd (D)	τ , мин	sd (τ)
1	$4,10 \times 10^{-7}$	4.76×10^{-10}	40	0.05
2	$1,07 \times 10^{-6}$	1.23×10^{-9}	8	0.01
3	$7,17 \times 10^{-7}$	1.88×10^{-10}	25	0.01
4	$2,34 \times 10^{-6}$	1.20×10^{-9}	20	0.01
5	$1,15 \times 10^{-6}$	7.28×10^{-10}	10	0.01
5	$6,89 \times 10^{-8}$	7.46×10^{-11}	88	0.10
7	$2,73 \times 10^{-7}$	2.07×10^{-10}	60	0.04
8	$1,64 \times 10^{-6}$	2.71×10^{-9}	19	0.04
9	$2,73 \times 10^{-7}$	1.96×10^{-9}	22	0.01
Средние значения	$(8,83 \pm 7,47) \times 10^{-7}$		33±26	

В таблице 10 отображена эффективность пропускания 80%-раствора глицерина на длинах волн: 500-600 нм, 600-700 нм и 700-900 нм. Хорошо

видно, из полученных данных, что в течение часа эффективность оптического пропускания увеличивается с увеличением длины волны, это связано с большим рассеянием света в коротковолновой области спектра.

Таблица 10. Эффективность оптического пропускания 80%-раствора глицерина на длине волны: 500-600 нм , 600-700 нм и 700-900 нм.

Образец	500-600 нм	600-700 нм	700-900 нм
1	0,325	0,392	0,457
2	0,395	0,431	0,463
3	0,265	0,303	0,336
4	0,095	0,120	0,141
5	0,348	0,404	0,457
6	0,283	0,336	0,383
7	0,325	0,392	0,457
8	0,050	0,068	0,097
9	0,276	0,198	0,387
Средние значения	0,262±0,123	0,294±0,137	0,353±0,149

При сравнении результатов, полученных при иммерсии образцов кожи в 40%-растворе и 80%-растворе глицерина, видно, что процесс просветления протекает одинаково, но с различной скоростью, что подтверждается полученными коэффициентами диффузии. Разная скорость может быть следствием более высокой вязкости 80%-раствора глицерина, в то же время при использовании 80%-раствора глицерина достигается лучшая эффективность оптического просветления кожи, что требует больше времени. В свою очередь большая эффективность просветления вызвана более сильным осмотическим давлением, создаваемым более концентрированным раствором. Также это связано с тем, что показатели преломления растворов различны. Показатели преломления коллагена и 80%-

раствора глицерина более близки, поэтому эффективность просветления кожи выше.

Заключение

В данной работе исследовались оптические и диффузионные характеристики ткани кожи *ex vivo* при воздействии на нее растворов глицерина 40-% и 80-% концентрации.

Полученные результаты показывают эффективность применения растворов глицерина в качестве оптических просветляющих агентов для управления оптическими характеристиками кожи. Наблюдалось значительное увеличение коэффициента пропускания коллимированного излучения, прошедшего через кожу, что способствует увеличению глубины проникновения оптического излучения в биоткань.

Измеренные средние значения коэффициентов диффузии глицерина кожи крысы составили для 40%-раствора глицерина: $(9,28 \pm 1,59) \times 10^{-7}$ см²/сек и для 80-%-раствора глицерина: $(8,83 \pm 7,47) \times 10^{-7}$ см²/сек.

Список литературы:

1. Тучин, В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике / В.В. Тучин. М. : ФИЗМАТЛИТ, 2012. 812 с.
2. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Долотов Л.Е., Правдин А.Б., Тучин В.В. Общий биофизический практикум. Биофотоника. Саратов: Изд-во Саратов. Ун-та, 2011. - 144с.
3. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В./ Исследование оптических и диффузных явлений в биотканях при воздействии осмотически активных иммерсионных жидкостей
4. Башкатов А.Н. Управление оптическими свойствами биотканей при воздействии на них осмотически активными иммерсионными жидкостями. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. Саратов 2002.
5. Glycerine Producers Association, Physical properties of glycerine and its solutions, 1963, 27p.