

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

**«Оптическое просветление кожи *ex vivo* водными растворами
глицерина: концентрационная зависимость»**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 253 группы

03.04.02 «Физика» (Биофотоника)

Физического факультета

Генина Вадима Дмитриевича

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

А.Н. Башкатов

Заведующий кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

В.В. Тучин

Саратов 2017

Введение

Актуальность. Относительно низкая себестоимость оптических методов диагностики и лечения различных заболеваний, а также их безопасность для здоровья пациентов привели к тому, что эти методы сегодня активно используются в медицине. В то же время, одной из задач современной лазерной медицины, в области диагностических приложений, остается доставка зондирующего излучения в биоткани на необходимую глубину. Сложность решения данной задачи связана с тем, что пространственное разрешение изображений и глубина зондирования излучением в видимом и ближнем ИК спектральных диапазонах сильно ограничены рассеивающей способностью биотканей. Одним из способов решения данной проблемы может быть снижение светорассеяния за счет замещения внутритканевой жидкости иммерсионным агентом, т.е. использование так называемой техники «оптического просветления биотканей».

Как известно, главной причиной рассеяния оптического излучения в биотканях является различие показателей преломления структурных компонентов биотканей и внутритканевой среды или внутриклеточных органелл и клеточной цитоплазмы. Метод оптического просветления биотканей заключается в выравнивании показателей преломления путем частичного замещения внутритканевой жидкости оптическим просветляющим агентом (ОПА) - биосовместимым иммерсионным веществом. В настоящее время снижение светорассеяния биотканей под влиянием ОПА связывают с тремя процессами: осмотической дегидратацией биоткани, заменой внутритканевой жидкости ОПА и структурной модификацией или диссоциацией коллагена биоткани.

Два первых процесса обычно проявляются одновременно. Степень вклада каждого из них в эффект просветления определяется типом ОПА и

свойствами биоткани. Влияние третьего процесса становится заметным только при длительном воздействии ОПА на биоткань.

Водные растворы глицерина являются иммерсионными жидкостями, широко используемыми в качестве ОПА благодаря своей эффективности, доступности и биосовместимости. К сожалению, несмотря на широкое применение глицерина для управления оптическими параметрами биотканей, не существует однозначного ответа на вопрос об оптимальной концентрации раствора глицерина. И хотя данные представленные в литературе [ⁱ, ⁱⁱ] позволяют судить о максимально эффективной концентрации растворов глицерина с точки зрения степени оптического просветления, вопрос о концентрационной зависимости коэффициента диффузии глицерина в биотканях остается открытым.

Знание коэффициентов диффузии и механизмов взаимодействия исследуемых ОПА с биотканями необходимо для разработки и оптимизации методов оптического просветления биотканей, вследствие чего **целями** данной работы являются 1) исследование концентрационной зависимости коэффициента диффузии глицерина в коже; 2) исследование зависимости эффективности оптического просветления кожи от концентрации глицерина в иммерсионном просветляющем растворе; 3) исследование временной зависимости изменения весовых и геометрических параметров кожи при воздействии на нее водных растворов глицерина.

Структура ВКР:

Раздел 1. Строение и оптические параметры тканей кожи

Раздел 2. Методы управления оптическими параметрами биотканей

Раздел 3. Математические модели, описывающие транспорт лекарственных препаратов и иммерсионных жидкостей в биотканях

Раздел 4. Материалы и методы

Раздел 5. Результаты и обсуждение

Научная новизна работы: В ходе работы исследовано влияние концентрации водных растворов глицерина на оптические и структурные параметры кожи крысы *ex vivo*.

Положения, выносимые на защиту: Полученные результаты позволяют оценить эффективность применения водных растворов глицерина разных концентраций в качестве просветляющих агентов для управления рассеивающими характеристиками кожи. Исследование кинетики веса и геометрических параметров образцов кожи показывает, что зависимость относительного изменения данных параметров от концентрации растворов глицерина нелинейная.

Основное содержание работы

Для исследования кинетики изменения каждого из параметров в качестве экспериментальных объектов использовалось по 10 образцов кожи белых лабораторных крыс *ex vivo*. При исследовании кинетики изменения структурных параметров кожи (веса, толщины и площади), таким образом, использовалось всего 80 образцов. Предварительно с поверхности тела крыс с помощью крема-депилятора тщательно удалялся волосяной покров. При помощи хирургических ножниц вырезались участки кожи размером приблизительно 10×15 мм². Подкожный жировой слой, являющийся препятствием для проникновения гидрофильных веществ в дерму, тщательным образом удалялся. Толщина образцов измерялась микрометром с точностью ± 10 мкм: каждый образец помещался между предметными стеклами, после чего толщина измерялась в пяти точках; результаты усреднялись.

В связи с тем, что образцы кожи имели не совсем правильную форму, для точного определения площади они помещались на тест-объект со шкалой и фотографировались с помощью цифровой камеры. Далее программным

способом изображения обрабатывались и производился подсчет площади образцов.

Весовые измерения проводились на электронных весах с точностью ± 1 мг.

Толщина, площадь и вес образцов измерялись до помещения образцов в ОПА и через каждые 5-10 мин после помещения их в чашку Петри, заполненную ОПА, в течение 1-3 часов. Для этого образцы вынимались из чашки Петри, излишки агента аккуратно удалялись с поверхности фильтровальной бумагой, после чего происходило измерение одного из параметров.

Для оптических измерений использовалось 60 образцов кожи крысы *ex vivo*. Подготовка образцов проводилась по описанной выше методике.

Для измерения коллимированного пропускания использовалась установка, состоящая из источника излучения – галогенной лампы *HL-2000* (*Ocean Optics*, США), оптических волокон *P400-1-UV-VIS* (*Ocean Optics*, США), подводящих излучение к образцу биоткани и собирающих излучение, прошедшее через образец, кюветы с образцом, спектрометра *USB4000-Vis-NIR* (*Ocean Optics*, США) и компьютера. Схема установки представлена на рисунке 1. Для измерения коллимированного пропускания образцы биоткани закреплялись на пластиковом держателе размером 38×17 мм² с отверстием 8×8 мм² и помещались в стеклянную кювету объемом 5 мл между двумя волоконно-оптическими кабелями с внутренним диаметром 400 мкм. Одно волокно служило для доставки излучения к образцу, а другое – для сбора прямо прошедшего излучения. Для обеспечения коллимированности пучка на торцах волокон с помощью стандартных разъемов *SMA-905* закреплялись коллиматоры *74-ACR* (*Ocean Optics*, США).

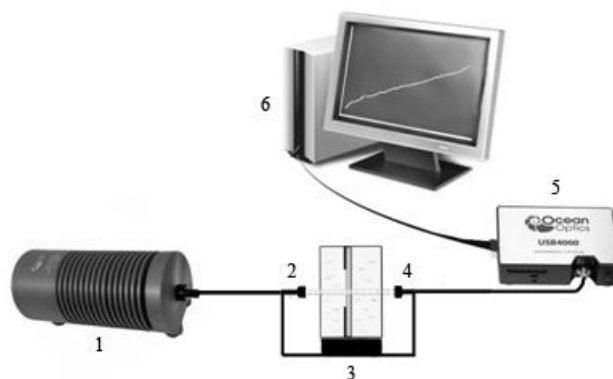


Рисунок 1 - Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца кожи: 1 - источник света *HL-2000*; 2, 4 - оптическое волокно с коллиматором; 3 - кювета с зафиксированным в держателе образцом; 5 - спектрометр *USB-4000-Vis-NIR*; 6 - персональный компьютер

Кинетика изменения коллимированного пропускания регистрировалась путем последовательной записи спектров коллимированного пропускания в диапазоне 500-900 нм каждые 5-10 минут в течение 1.5-3 часов. Для нормировки перед началом измерений регистрировался сигнал сравнения от кюветы, заполненной ОПА, с держателем без образца кожи. Все измерения проводились при комнатной температуре ($\sim 20^{\circ}\text{C}$).

В качестве просветляющих агентов использовались водные растворы глицерина различных концентраций («Реахим», Россия). Показатели преломления исследуемых ОПА, измеренных с помощью рефрактометра Аббе на длине волны 589 нм, представлены в таблице 1.

При исследовании взаимодействия ОПА с образцами кожи предполагалось, что в результате этого взаимодействия изменяется только показатель преломления внутритканевой жидкости образца, вследствие диффузии в биоткань иммерсионной жидкости и осмотического оттока воды из биоткани. При диффузии внутрь биоткани вещества с показателем преломления большим, чем у внутритканевой жидкости, и оттока воды из биоткани происходит согласование показателей преломления рассеивателей

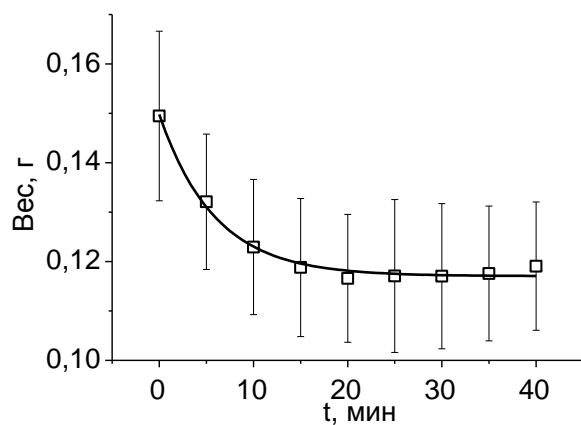
и внутритканевой жидкости, что приводит к уменьшению коэффициента рассеяния биоткани. Исследование кинетики данного процесса позволяет оценить коэффициент диффузии как меру средней скорости обменного потока осмотической жидкости в биоткань и воды из биоткани.

Метод оценки коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биотканях основан на измерении временной зависимости изменения коллимированного пропускания образцов биотканей, помещенных в раствор просветляющей жидкости. Для кожи проникновение иммерсионной жидкости происходит только с внутренней стороны образца (со стороны дермы), что объясняется защитными свойствами эпидермиса, препятствующего проникновению иммерсионного агента внутрь кожи.

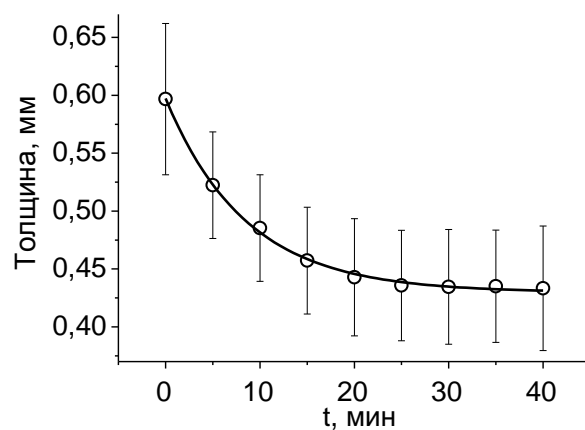
Таблица 1 - Показатели преломления использованных в качестве ОПА водных растворов глицерина

Концентрация водного раствора глицерина	Показатель преломления	Вязкость водных растворов глицерина, мПа·сек [Ошибка! Закладка не определена.]
30%	1.378	2.5
50%	1.399	6
60%	1.415	10.8
70%	1.428	22.5
80%	1.443	60.1
85%	1.452	109
90%	1.459	219
100%	1.472	1410

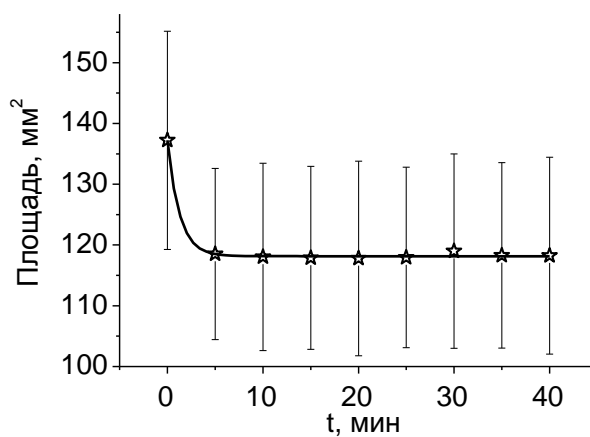
На графиках (рисунки 2-5) представлены временные зависимости структурных параметров кожи (вес, толщина, площадь), погружённой в водные растворы глицерина с концентрациями соответственно 50%, 80%, 90% и 100%.



a

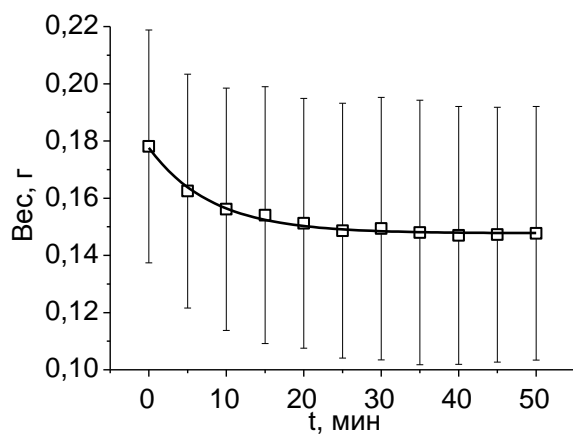


б

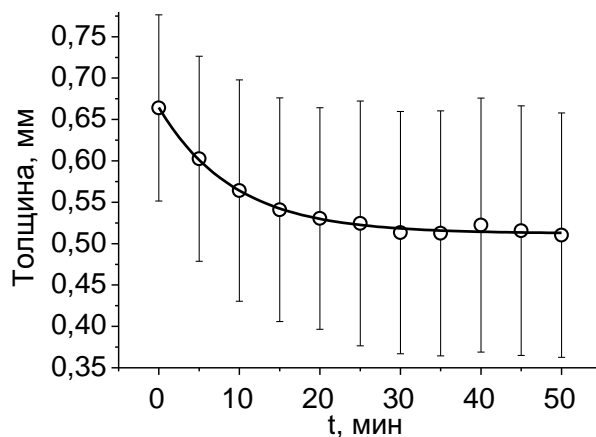


в

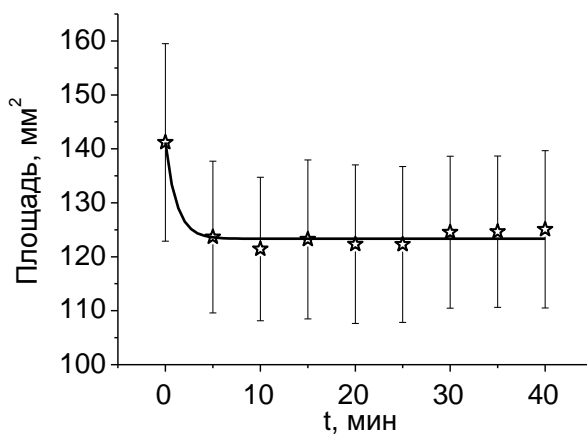
Рисунок 2 - Динамики изменения структурных параметров (*a* - веса, *б* - толщины, *в* - площади) образцов кожи под действием водного раствора глицерина 50%



a

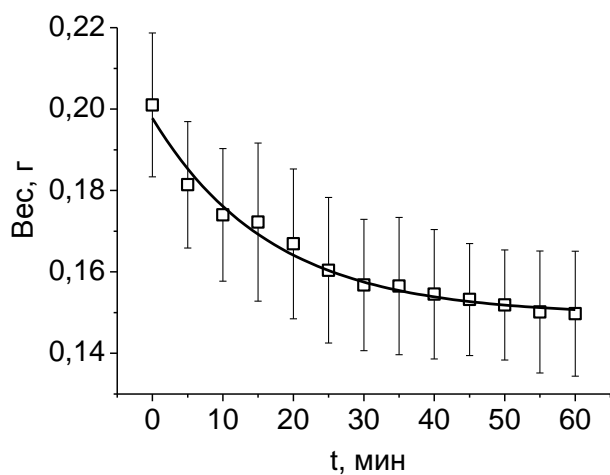


б

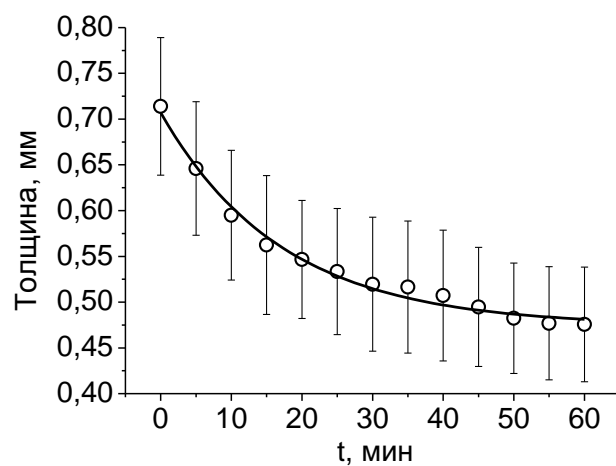


в

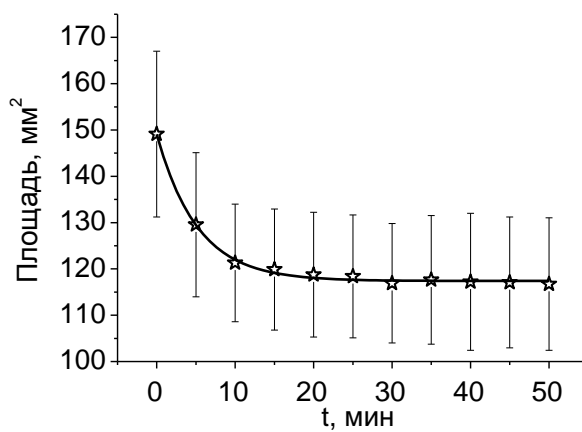
Рисунок 3 - Динамики изменения структурных параметров (*a* - веса, *б* - толщины, *в* - площади) образцов кожи под действием водного раствора глицерина 80%



a

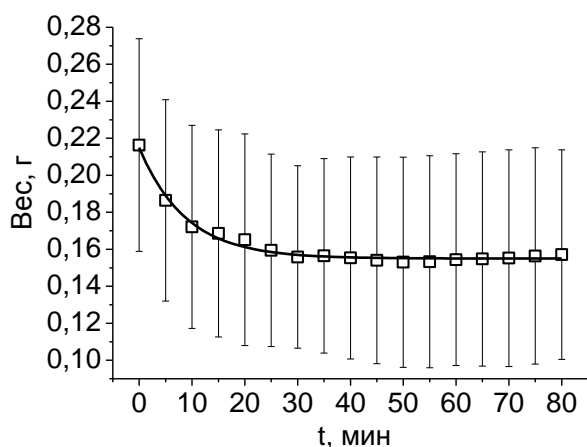


б

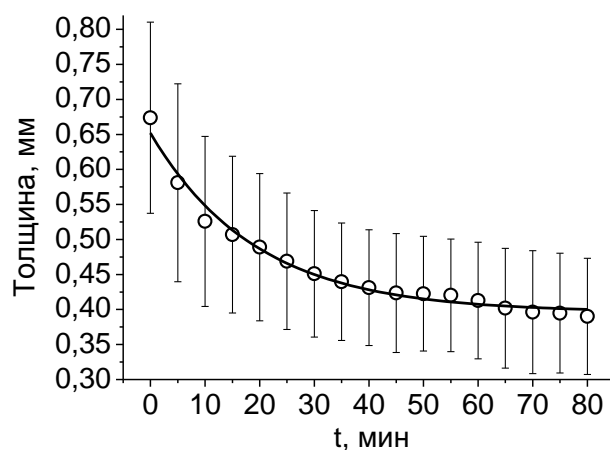


в

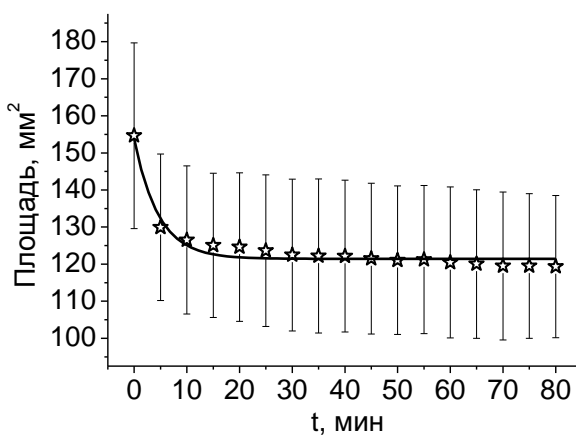
Рисунок 4 - Динамики изменения структурных параметров (*a* - веса, *б* - толщины, *в* - площади) образцов кожи под действием водного раствора глицерина 90%



a



б



в

Рисунок 5 - Динамики изменения структурных параметров (*a* - веса, *б* - толщины, *в* - площади) образцов кожи под действием водного раствора глицерина 100%

На рисунках хорошо видно, что в ходе эксперимента значения всех исследуемых параметров уменьшаются. Можно сделать вывод, что на данном временном отрезке основной вклад в процесс оптического просветления вносит дегидратация: диффузия воды из межтканевого пространства в окружающий гипертонический раствор.

Из представленных графиков (см. рисунки 2-5) следует, что вес образцов за время эксперимента уменьшился в среднем на 20%, 15%, 25% и

25%, толщина – на 30%, 20%, 35% и 40%, площадь – на 15%, 15%, 20% и 20% под действием соответственно водных растворов глицерина 50%, 80%, 90% и 100%. Данные исследования показывают, что зависимость относительного изменения геометрических параметров и веса образцов от концентрации растворов глицерина нелинейная. На наш взгляд это связано с сочетанием осмотических свойств используемых растворов и их вязкостью (см. таблицу 3). Поскольку вязкость глицерина и осмотическое давление, оказываемое на ткань, увеличиваются с повышением концентрации раствора (см. рисунок 8), то можно заключить, что максимальное снижение веса образцов под действием 90% и 100% растворов глицерина вызвано значительной дегидратацией образцов. Аналогичная нелинейная зависимость наблюдается и для геометрических параметров образцов.

Результаты анализа кинетики дегидратации с использованием уравнения

$$\frac{A(t=0) - A(t)}{A(t=0)} = B \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + y_0, \quad (1)$$

где A соответствует измеряемой величине (вес, толщина, площадь), τ характеризует скорость процесса дегидратации, параметр B характеризует величину относительного уменьшения измеряемого параметра, а параметр y_0 - остаточную величину измеряемого параметра (параметры B и τ определялись методом наименьших квадратов), представлены в таблицах 2-5.

Таблица 2 - Параметры дегидратации кожи под действием водного раствора глицерина 50%

Параметр	Измеряемая величина		
	Вес	Толщина	Площадь
Максимальная степень дегидратации (B)	0.03±0.001	0.17±0.06	19.06±18.89
Постоянная скорости дегидратации (τ), мин	5.88±0.55	8.51±6.94	1.26±13.49
Остаточная величина после дегидратации (y_0)	0.12±0.001	0.43±0.03	118.16±5.90

Таблица 3 - Параметры дегидратации кожи под действием водного раствора глицерина 80%

Параметр	Измеряемая величина		
	Вес	Толщина	Площадь
Максимальная степень дегидратации (B)	0.03±0.04	0.15±0.12	17.84±19.09
Постоянная скорости дегидратации (τ), мин	8.10±27.31	9.28±19.23	1.18±16.37
Остаточная величина после дегидратации (y_0)	0.15±0.02	0.51±0.08	123.34±5.41

Таблица 4 - Параметры дегидратации кожи под действием водного раствора глицерина 90%

Параметр	Измеряемая величина		
	Вес	Толщина	Площадь
Максимальная степень дегидратации (B)	0.05±0.01	0.23±0.07	31.67±18.08
Постоянная скорости дегидратации (τ), мин	16.83±15.27	17.15±13.31	5.18±5.96
Остаточная величина после дегидратации (y_0)	0.15±0.01	0.47±0.05	117.40±5.44

Таблица 5 - Параметры дегидратации кожи под действием водного раствора глицерина 100%

Параметр	Измеряемая величина		
	Вес	Толщина	Площадь
Максимальная степень дегидратации (B)	0.06±0.06	0.23±0.07	32.42±25.22
Постоянная скорости дегидратации (τ), мин	8.79±16.73	17.15±13.31	4.56±7.04
Остаточная величина после дегидратации (y_0)	0.15±0.02	0.47±0.05	121.44±5.57

Значительная погрешность при оценке параметров связана с вариабельностью начальных значений данных параметров для различных образцов.

Из таблиц следует, что значения максимальной степени дегидратации, полученные из измерений веса и толщины образцов, практически совпадают, в то время как данный параметр, полученный из измерений площади образцов, имеет существенно большее значение, что свидетельствует о том, что

изменение структуры биотканей под действием ОПА существенно различается в продольном и поперечном сечениях образца.

Значения максимальной степени дегидратации прямо пропорциональны изменениям веса и геометрических параметров образцов кожи. Зависимости постоянной скорости дегидратации и остаточной величины после дегидратации от концентрации растворов глицерина также нелинейны.

В результате проведенных экспериментов была измерена кинетика изменения коллимированного пропускания кожи под действием водных растворов глицерина разных концентраций в диапазоне 500-900 нм.

На графике (рисунок 6) представлены типичные спектры и кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи при воздействии 100%-раствора глицерина в течение 120 минут.

Из представленных на рисунке 6 графиков видно, что в начальный момент времени кожа представляет собой практически непрозрачную среду для видимого и ближнего ИК излучений. По мере проникновения ОПА во внутритканевую жидкость наблюдается уменьшение рассеяния и, соответственно, увеличение коллимированного пропускания. Видно, что оптическое просветление образца кожи происходит во всем диапазоне длин волн с преобладанием в красной области спектра.

На рисунке 6(б) хорошо видно, что в течение первых 100-110 минут наблюдается рост коллимированного пропускания. При этом можно предположить, что диффузия ОПА в биоткань и воды из межтканевого пространства в окружающий образец раствор происходит одновременно и оба этих процесса вносят свой вклад в увеличение коэффициента коллимированного пропускания в течение начального периода просветления.

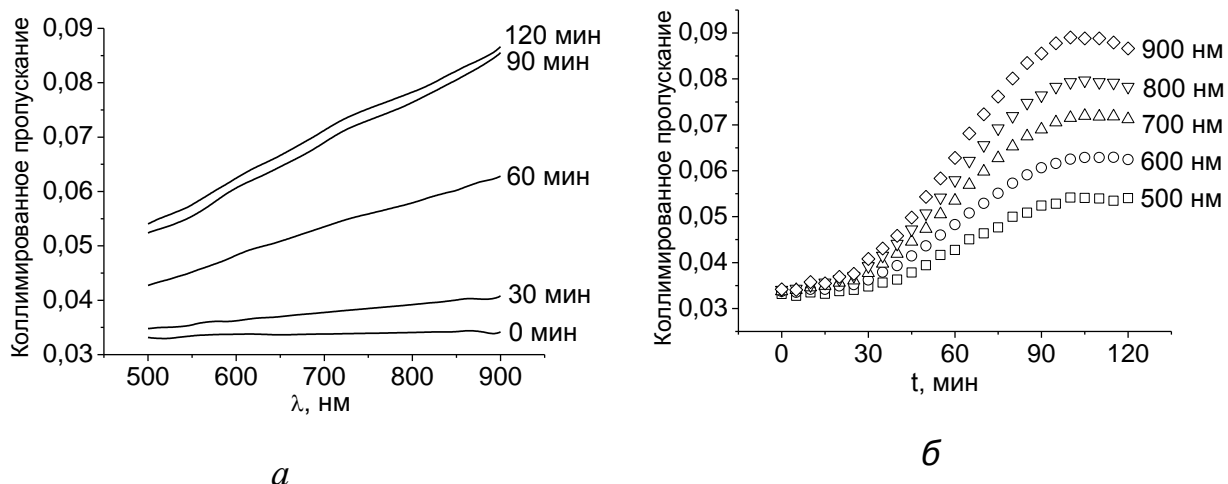


Рисунок 6 - Типичные спектры коллимированного пропускания образца кожи крысы *ex vivo*, измеренные в различные моменты времени после помещения его в 100%-раствор глицерина (а) и типичная кинетика изменения коэффициента коллимированного пропускания образца кожи, измеренная на нескольких длинах волн (б)

Оценка коэффициента диффузии водных растворов глицерина в коже крысы *ex vivo* была выполнена на основе анализа кинетики изменения коллимированного пропускания кожи с использованием алгоритма, представленного в разделе 3 ("Математические модели, описывающие транспорт лекарственных препаратов и иммерсионных жидкостей в биоткани"). В таблице 6 представлены вычисленные в ходе работы коэффициенты диффузии каждого из растворов глицерина, а также коэффициенты эффективности оптического просветления кожи, сгруппированные по трем спектральным диапазонам. Достаточно большие значения среднеквадратичного отклонения при определении значений коэффициентов диффузии связаны с естественным разбросом оптических и структурно-морфологических параметров образцов кожи.

Таблица 6 - Значения коэффициентов диффузии водных растворов глицерина в коже и коэффициентов эффективности оптического просветления кожи

Концентрация раствора глицерина	Толщина образцов кожи, мм	Эффективность оптического просветления в области 500-600 нм	Эффективность оптического просветления в области 600-700 нм	Эффективность оптического просветления в области 700-900 нм	Коэффициент диффузии, см ² /сек
30%	0.60±0.08	0.055±0.038	0.072±0.045	0.091±0.052	$(2.79±1.12) \times 10^{-6}$
50%	0.38±0.11	0.156±0.065	0.195±0.067	0.240±0.067	$(1.04±0.52) \times 10^{-6}$
60%	0.32±0.10	0.308±0.126	0.334±0.115	0.362±0.108	$(1.098±0.62) \times 10^{-6}$
70%	0.48±0.07	0.224±0.089	0.267±0.098	0.308±0.104	$(0.86±0.73) \times 10^{-6}$
85%	0.57±0.16	0.239±0.059	0.248±0.051	0.251±0.046	$(1.81±1.13) \times 10^{-6}$
100%	0.46±0.13	0.327±0.124	0.383±0.14	0.422±0.124	$(3.23±2.21) \times 10^{-6}$

На рисунке 7(a) представлена диаграмма зависимости коэффициента диффузии глицерина в коже от концентрации растворов глицерина. Хорошо видно, что коэффициент диффузии сначала спадает (до 70%-ой концентрации), а затем наблюдается рост коэффициента диффузии. Подобное поведение хорошо коррелирует с концентрационной зависимостью коэффициента диффузии глицерина в воде и объясняется как повышением вязкости диффундирующего раствора, так и особенностями формирования гидродинамического радиуса диффундирующих молекул.

Таким образом, при оптическом просветлении кожи водными растворами глицерина с концентрацией 30-70% снижение скорости диффузии глицерина связано с ростом вязкости диффундирующего раствора. Для высококонцентрированных (85-100%) растворов глицерина мы имеем два конкурирующих процесса: резкое увеличение вязкости диффундирующего раствора и уменьшение гидродинамического радиуса молекул глицерина. Как видно из рисунке 7(a), вклад второго процесса оказывается доминирующим, и мы наблюдаем рост коэффициента диффузии. Помимо этого, необходимо отметить, что, как было указано выше, коэффициент диффузии, измеренный в настоящей работе, является мерой

средней скорости обменного потока гиперосмотической жидкости (раствора глицерина) в биоткань и воды из биоткани и, соответственно, для более корректного определения скорости диффузии глицерина в биоткани, необходимо разделение этих процессов, что будет являться целью наших дальнейших исследований.

На рисунке 7(б) показана зависимость эффективности оптического просветления кожи от концентрации растворов глицерина. Из рисунка 7(б) следует, что большее значение коэффициента диффузии ОПА не является гарантией более эффективного оптического просветления биоткани. Среди исследуемых ОПА, несмотря на высокую скорость проникновения в биоткань, наименьшая эффективность оптического просветления наблюдается для 30%-го раствора глицерина. Это связано с тем, что хотя 30%-ый раствор глицерина является наименее вязкой жидкостью, в то же время он обладает и наименьшим значением показателя преломления.

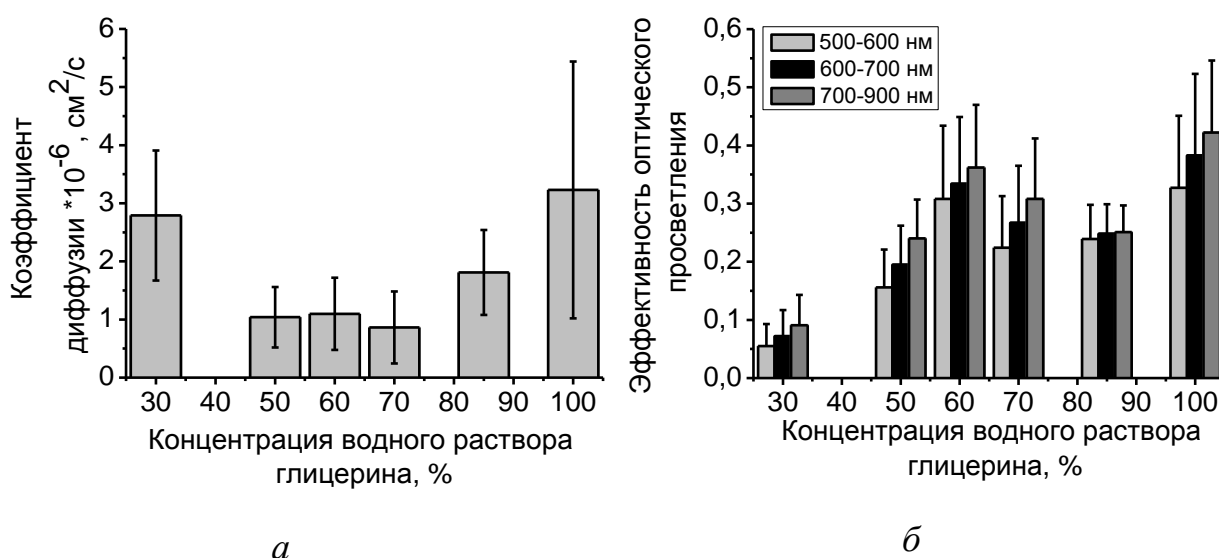


Рисунок 7 - Значения коэффициентов диффузии (а) и коэффициенты эффективности оптического просветления кожи крысы *ex vivo* в трех различных спектральных диапазонах (б) в зависимости от концентрации раствора глицерина. Вертикальные линии соответствуют

среднеквадратичному отклонению

Рост коэффициента эффективности оптического просветления кожи при использовании в качестве ОПА растворов глицерина с концентрациями 30-60% объясняется всё большим (при переходе от 30% к 60%-раствору) согласованием показателей преломления ОПА (1.378 для 30%-раствора и 1.415 для 60%-раствора) и коллагеновых волокон (1.411-1.416 [**Ошибка! Закладка не определена.**]), являющихся основными рассеивателями кожи. Затем эффективность оптического просветления снижается, что связано с тем, что значение показателя преломления ОПА становится больше, чем значение показателя преломления коллагеновых волокон.

При значениях концентрации раствора глицерина от 85% до 100%, значения эффективности оптического просветления снова увеличивается. По-видимому, этот эффект связан с преобладанием дегидратационного механизма оптического просветления, при котором наблюдается уменьшение толщины образца кожи, вследствие его дегидратации, а следовательно, и увеличение его коллимированного пропускания. Возможно, происходит увеличение показателя преломления коллагеновых волокон, вследствие разрушения их гидратных оболочек, что будет приводить к лучшему согласованию показателей преломления рассеивателей кожи и окружающей их среды, в роли которой в данном случае будут выступать высококонцентрированные растворы глицерина. Однако это предположение требует дальнейших исследований.

Заключение

Полученные результаты позволяют оценить эффективность применения водных растворов глицерина разных концентраций в качестве просветляющих агентов для управления рассеивающими характеристиками кожи. Наибольшую эффективность оптического просветления в спектральном диапазоне 500-900 нм продемонстрировали 60% и 100%-

растворы глицерина. Достаточно высокой скоростью диффузии и при этом высокой эффективностью оптического просветления обладает 85%-раствор глицерина.

Исследование кинетики веса и геометрических параметров образцов кожи показывает, что зависимость относительного изменения данных параметров от концентрации растворов глицерина нелинейная. Наименьшая степень дегидратации наблюдается при использовании 80%-раствора глицерина.
