

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
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 глюкозы:
концентрационная зависимость

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 4082 группы

направления 12.03.04 "Биотехнические системы и технологии"

Института физики

Шаповала Романа Михайловича

Научный руководитель
Доцент кафедры оптики и
биофотоники, к.ф.-м.н.



А.Н. Башкатов

Зав. кафедрой оптики и биофотоники
член.-кор РАН, профессор, д.ф.-м.н



В.В. Тучин

Саратов 2021 год

Введение

На данный момент времени все больший интерес приобретает развитие оптической биомедицинской диагностики и терапии. Интерес к данной тематике обусловлен многими факторами, одним из которых является фундаментальные исследования по взаимодействию оптического излучения с биологической тканью, а также в разработке средств доставки лекарственных препаратов через биоткань.

Внимание учёных и врачей направленно на изучении вопроса об изменении свойств биологических тканей при помощи изменения их структурных параметров. Все большую актуальность как методы решения поставленной глобальной задачи обретают методы фототерапии, которые могут существенно влиять как на геометрические параметры биотканей, так и на закономерности тканевого метаболизма [1].

Для решения поставленной проблемы необходимо найти динамику изменения рассеивающих характеристик биотканей. Для этого используются иммерсионные жидкости, которые путём 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].

Целью работы является исследование концентрационной зависимости характеристик ткани кожи *ex vivo* при воздействии водных растворов глюкозы 10, 20, 30, 40 и 50-ю процентной концентрации.

Научная значимость данной работы является весьма актуальной, так как исследований зависимости скорости коэффициента диффузии от концентрации растворов глюкозы ранее рассмотрены не были.

1 Материалы и методы

1.1 Алгоритм анализа изменения структурных параметров биотканей под действием гиперосмотических иммерсионных агентов

В качестве образцов биотканей в экспериментальных исследованиях использовалась кожа полученная от белых аутбрендных лабораторных крыс *ex vivo*. Предварительно шерсть с поверхности кожи удалялась с помощью бритвы «Gillette» (The Procter and Gamble, США), после чего обрабатывалась физиологическим раствором для удаления остатков шерсти с поверхности ткани.

С помощью хирургических ножниц и скальпеля вырезались образцы кожи площадью приблизительно $1 \times 1,2 \text{ мм}^2$. Подкожный жировой слой, препятствующий проникновению гиперосмотическому химическому агенту, удалялся.

В каждой серии экспериментов использовалось по пять образцов биотканей. которые помещались в водные растворы порошкового моногидрата глюкозы («ХимМед», Россия) с концентрациями 0,1 г/мл, 0,2 г/мл, 0,3 г/мл, 0,4 г/мл и 0,5 г/мл.

Для точной оценки полученной концентрации растворов измерялся показатель преломления на рефрактометре Аббе ИРФ-454Б2М («ЛОМО», Россия). При работе с рефрактометром использовался раствор, мерная пипетка и вата для очищения поверхности линз после нанесения раствора.

Толщина образцов, помещённых между двумя предметными стёклами, измерялась в десяти точках микрометром с точностью $\pm 5 \text{ мкм}$

Взвешивание образцов кожи проводилось на электронных весах SA210 (Scientech, США) с точностью $\pm 1 \text{ мг}$. Для каждого образца было проведено порядка десяти измерений до и после применения иммерсионного агента.

Во время проведения экспериментальных работ образцы биоткани до и после применения оптического просветляющего агента (ОПА) фиксировались в качестве цифровых изображений.

Из полученных цифровых изображений вычислялась площадь образцов. Для оценки площади образца сначала изображение обрабатывалось с помощью функции READ_RED программного обеспечения MathCad (Parametric Technology Corporation, США). Число пикселей занимаемых образцом подсчитывались и переводились в квадратные миллиметры с помощью следующего уравнения:

$$S = \frac{F(H_s)}{\text{cols}(H_s)\text{rows}(H_s)} \frac{\text{rows}(H)z^2}{\text{cols}(H)} \quad (1.1)$$

где F - функция, рассчитывающая число пикселей занимаемых образцом;

cols и rows - соответственно количество колонок и строк изображения;

H - первоначальное изображение образца;

H_s - изображение образца без фона;

z - ширина изображения.

Полученные значения толщины и площади образца использовались для учёта изменений его объёма $V_{обр.}$:

$$V_{обр.} = S_{обр.} \cdot l_{обр.} \quad (1.2)$$

где $S_{обр.}$ - площадь образца;

$l_{обр.}$ - толщина образца.

Все полученные итоговые результаты исследований записывались в текстовом формате. Значения параметров усреднялись и обрабатывались в математическом пакете Origin (OriginLab Corporation, США).

1.2 Экспериментальная установка для измерения кинетики изменения оптических параметров биотканей под действием гиперосмотических иммерсионных агентов

Образец биологической ткани закрепляется на пластиковой рамке с размерами $1 \times 1,5 \text{ см}^2$ и помещался в стеклянную кювету объемом 5 мл с ОПА. Кювета с образцом устанавливалась между двумя волоконно-оптическими кабелями (P400-1-UV-VIS, Ocean Optics, США).

Для создания коллимированного пучка света на торцах волокон с помощью стандартных разъёмов SMA-905 закреплялись коллиматоры 74-ACR (Ocean Optics, США). Измерение спектров пропускания производилось многоканальным спектрометром USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) в диапазоне от 400 до 1000 нм. В качестве источника излучения использовалась галогенная лампа HL2000 (Ocean Optics, США).

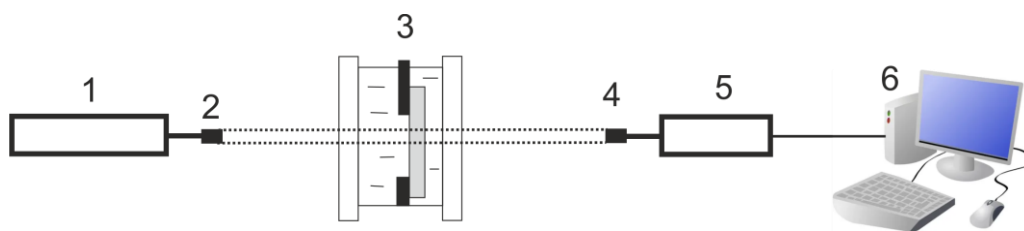


Рисунок 1 - схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца кожи: 1 - источник излучения галогеновая лампа HL-2000; 2,4 - оптические волокна с коллиматорами; 3 - кювета с зафиксированным в рамке образцом биоткани помещенном в ОПА; 5 - спектрометр USB-4000-Vis-NIR; 6 - персональный компьютер.

Для исследования коллимированного пропускания одно из оптических волокон использовалось в качестве источника света, который проходит через образец помещённый в кювету с ОПА. Выделившийся узкий пучок света после прохождения через образец фиксировало второе оптическое волокно, используемое в качестве оптического датчика.

Кинетика изменения измерялась через последовательную запись спектров коллимированного пропускания в диапазоне длин волн от 400 до 900 нм, в течении определённого промежутка времени каждые 2-5 мин. Все измерения проводились при комнатной температуре ($\sim 20^{\circ}\text{C}$).

Кинетика коллимированного пропускания кожи была использована для получения коэффициентов диффузии.

1.3 Алгоритм определения коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биотканях

При решении одномерной задачи диффузии, используется уравнение представляющее собой второй закон Фика [3]:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (1.3)$$

где $C(x,t)$ - концентрация ОПА в образце биоткани, г/мл;

D - коэффициент диффузии раствора ОПА, $\text{см}^2/\text{с}$;

t - время, в течении которого происходит процесс диффузии, с;

x - пространственная координата по толщине образца биоткани, см.

В первом приближении решение второго закона Фика для диффузии имеет вид:

$$C(t) = C_0 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right) \quad (1.4)$$

где $C(t)$ - усреднённая по объёму концентрация ИОА внутри образца;

C_0 - концентрация глюкозы в иммерсионном растворе;

t - время, в секундах;

$\tau = \frac{l^2}{\pi^2 D}$ - характеристическое время диффузии, с;

l - толщина образца кожи, см;

D - коэффициент диффузии $\text{см}^2/\text{с}$.

Зависимость коллимированного коэффициента пропускания T_c образца ткани, помещённого в иммерсионную жидкость, от времени, для каждой длины волны может быть представлена как [4]:

$$T_c(t) \approx \frac{C(t)}{C_0} = 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.5)$$

Измерение характеристического времени диффузии τ проводится методом наименьших квадратов:

$$\tau = \frac{\sum_{j=1}^N t_j^2}{\sum_{j=1}^N (t_j \ln y_j)} \quad (1.6)$$

где t_j - момент измерения каждого значения T_c ;

$$y = 1 - T_c/A;$$

A - максимальное значение коллимированного коэффициент пропускания;

N - общее количество экспериментальных точек, полученных путем регистрации кинетики коллимированного коэффициента пропускания на фиксированной длине волны [5].

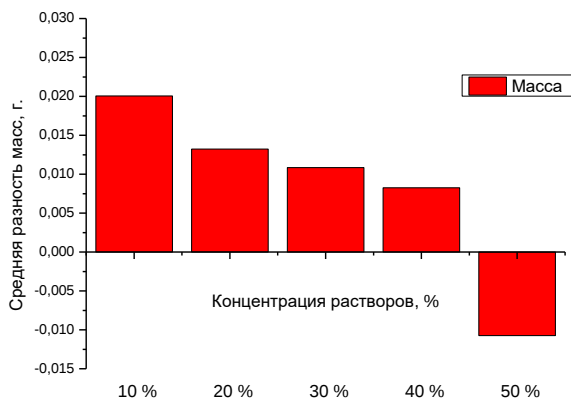
Коэффициент диффузии D определяется из соотношения:

$$\tau = \frac{l^2}{\pi^2 D} \quad (1.7)$$

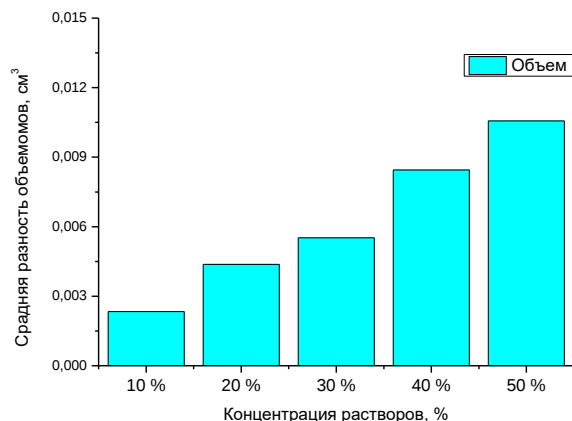
2 Результаты и обсуждение

2.1 Анализ изменения структурных параметров кожи под действием растворов глюкозы

На рисунке 2 представлены гистограммы средние значения изменения масс и объёма образцов от концентрации иммерсионного агента.



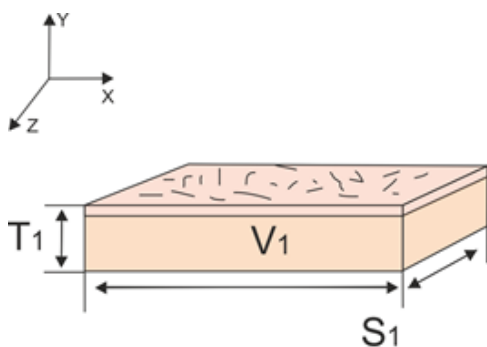
а)



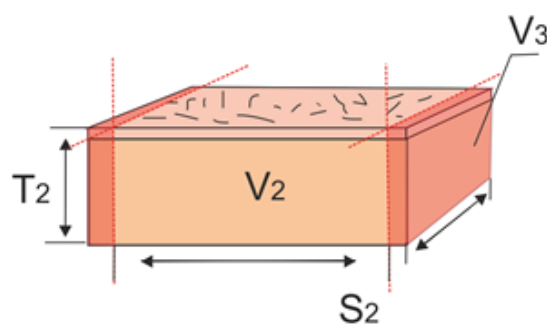
б)

Рисунок 2 - Гистограммы изменение массы (а) и объема (б) образцов от концентрации оптического просветляющего агента.

На основе полученных геометрических параметров на рисунке 3 схематично представлены образцы биоткани до и после использования оптического просветляющего агента.



а)



б)

Рисунок 3 - Схема изменения геометрических параметров биоткани до (а) использования иммерсионного раствора и после (б) использования ОПА: T_1 и T_2 - параметры толщины; S_1 и S_2 - параметры площадей; V_1 и V_2 - объемы образцов; V_3 - разность объемов образцов (отмечено красным).

Из рисунков можно наглядно понять, как изменяется структура биоткани после использования ОПА. В данном случае разность объёмов показана на рисунке 3 (б) из которого можно сделать вывод о том, что несмотря на уменьшения площади и массы, общий объем образцов увеличивается, значит присутствует осмотическое давление внутри тканей.

2.2 Кинетика изменения оптических параметров кожи под действием растворов глюкозы

На рисунке 4 представлены типичные графики коллимированного пропускания и кинетика изменения коллимированного пропускания образцов.

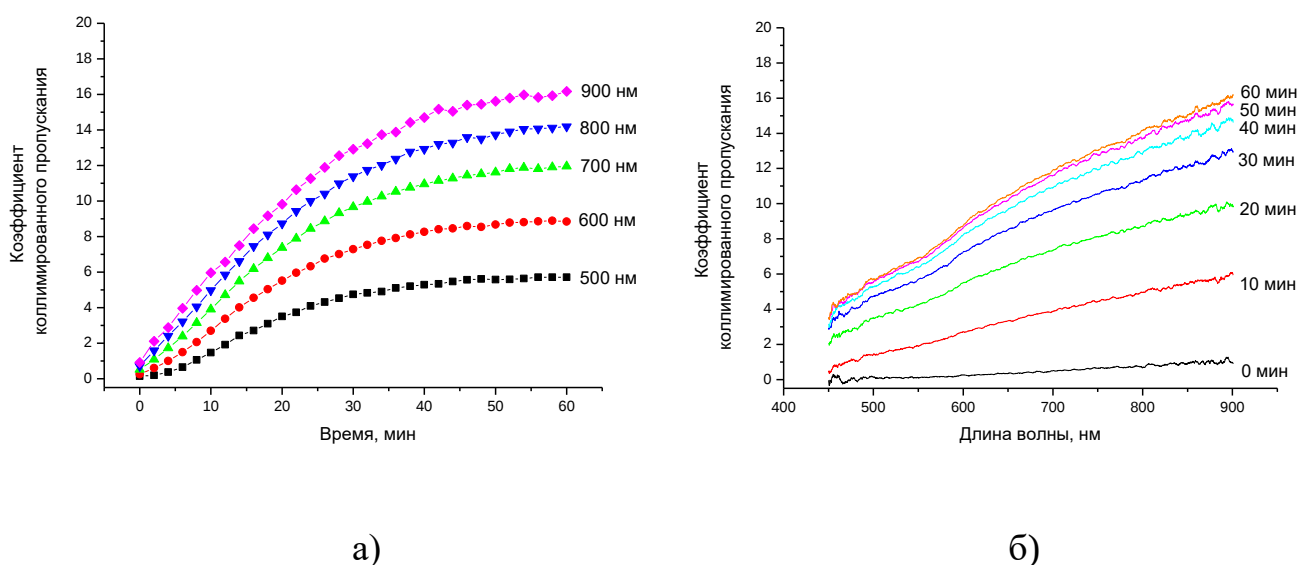


Рисунок 4 - Спектр коллимированного пропускания (а) и кинетика изменения коллимированного пропускания (б) кожи во время оптического просветления 50%-раствором глюкозы.

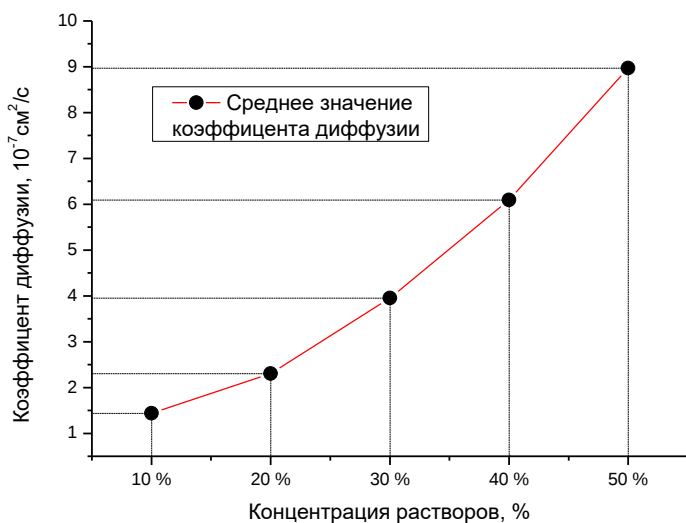
Из графика видно, что наблюдается значительное увеличение коэффициента пропускания кожи при его иммерсии в растворе, что обусловлено проникновением в биоткань иммерсионной жидкости и выхода

из неё воды, в результате чего происходит выравнивание показателей преломления коллагеновых волокон.

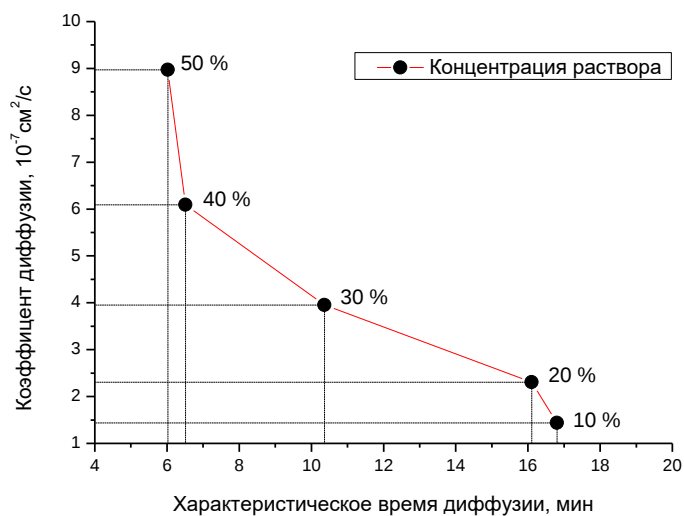
Полученные временные зависимости изменения коллимированного пропускания под действием разных концентрации растворов глюкозы использовались для оценки коэффициента диффузии глюкозы в коже.

2.3 Определение коэффициентов диффузии растворов глюкозы в тканях кожи

На рисунке 5 представлены график концентрационной зависимости от коэффициента диффузии (а) и график зависимости среднего значения коэффициента диффузии от характеристического времени диффузии (б).



а)



б)

Рисунок 5 - График концентрационной зависимости от среднего значения коэффициента диффузии (а) и график зависимости среднего значения коэффициента диффузии от характеристического времени диффузии (б) для каждой концентрации раствора глюкозы.

На основе построенных графических изображений концентрационных зависимостей мы можем утверждать, что значения коэффициента диффузии обратно пропорционально характеристическому времени диффузии в зависимости от концентрации применяемого иммерсионного оптического агента глюкозы.

Заключение

В данной работе исследовалась концентрационная зависимость оптических и диффузионных характеристик ткани кожи *ex vivo* при воздействии на неё растворов глюкозы 10, 20, 30, 40 и 50 процентной концентрации.

Представлены спектры коллимированного пропускания образцов кожи для каждой исследуемой концентрации.

Рассмотрен алгоритм для определения коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биотканях при решении одномерной задачи диффузии.

Определена динамика изменения кожи в зависимости от концентрации просветляющего агента. Построена концентрационная зависимость от среднего коэффициента диффузии исследуемых образцов кожи.

Список использованных источников:

1. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях / В. В. Тучин. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 488с.
2. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление биологических тканей – перспективы применения в медицинской диагностике и фототерапии// Альманах клинической медицины, 2010. – С. 39 - 42
3. Старк Дж.П. Диффузия в твёрдых телах / Старк Дж.П. – М.: Энергия. – 1980, 240 с.
4. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Каменских Т.Г., Тучин В.В. Оптическое просветление склеры глаза человека водным раствором 30%-ным раствором глюкозы// Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика, 2015. Т. 15, вып.3. – С. 18 - 24.
5. Спектроскопия рассеивающих сред: учебное пособие / В. И. Кочубей [и др.] – С. : Новый ветер, 2014. - 86с.