

На правах рукописи

Тучина Дарья Кирилловна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
В НОРМЕ И ПРИ МОДЕЛЬНОМ ДИАБЕТЕ**

03.01.02 – Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов 2016

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель:

Башкатов Алексей Николаевич,
кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты:

Захаров Валерий Павлович,
доктор физико-математических наук,
профессор; ФГАОУ ВО «Самарский
национальный исследовательский
государственный университет имени
академика С.П. Королева»

Бугаева Ирина Олеговна,
доктор медицинских наук, профессор;
ФГБОУ ВО «Саратовский
государственный медицинский
университет имени В.И. Разумовского»

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Саратовский
государственный технический
университет имени Гагарина Ю.А.»

Защита диссертации состоится «20» декабря 2016 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.243.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», по адресу 410012, Саратов, ул. Астраханская, д. 83, корпус III, аудитория 34.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте <http://www.sgu.ru/research/dissertation-council/d-212-243-05/kandidatskaya-dissertaciya-tuchinoy-dari-kirillovny>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физико-математических наук,
профессор

Павлов Алексей Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Сахарный диабет – эндокринное заболевание, для которого характерно повышенное содержание глюкозы в организме. По данным всемирной организации здравоохранения в 2012 - 2013 годах диабет стал причиной приблизительно пяти миллионов смертей, что сделало его восьмой по значимости причиной смерти во всем мире. К 2030 году прогнозируется увеличение количества смертей примерно на 50% и перемещение сахарного диабета на седьмое место. Основные осложнения при заболевании сахарным диабетом связаны с гликированием белков - результатом взаимодействия молекул глюкозы с белками. Белки составляют значительную часть многих биотканей, поэтому их гликирование приводит к изменению структуры тканей, ограничению их функционирования (Tseng J.-Y. et al., 2011, Blackwell J. et al., 2008), метаболическому дисбалансу и, в конечном итоге, к нарушению работы органов (Vigneshwaran N. et al., 2005). В силу того, что структура биотканей определяет во многом их оптические свойства, становится возможным осуществление мониторинга этих изменений структуры ткани оптическими методами.

С целью определения степени гликированности белков ранее были выполнены исследования флуоресцентных свойств гликированного гемоглобина и различных биотканей (Tseng J.-Y. et al., 2011, Blackwell J. et al., 2008, Kim B.-M. et al., 2000, Hull E.L. et al., 2004, Kinnunen J. et al., 2012, Gopalkrishnapillai B. et al., 2003, Hwang Y.-J. et al., 2011). Исследовались модифицированные в результате гликирования стенки сосудов (Goldin A. et al., 2006), преломляющие свойства эритроцитов здоровых и больных диабетом пациентов (Mazarevica G. et al., 2002), оптические свойства кожи страдающих диабетом (Khalil O.S., 2004). Многочисленные работы посвящены исследованию содержания свободной глюкозы в крови, внутритканевой жидкости (ВТЖ), и других жидкостях тела (Ullah H. et al., 2011, Purvinis G. et al., 2011, Dingari N. C. et al., 2011, Pleitez M. A. et al., 2013), разработкам методов мониторинга диабета, основанных на различии оптических свойств биотканей в норме и при диабете (Selvin E. et al., 2010, Tseng J.-Y. et al., 2011, Blackwell J. et al., 2008, Vigneshwaran N. et al., 2005).

Анализ литературы показывает, что изучение гликированных биологических тканей является востребованным и перспективным научным направлением. Поскольку проницаемость биоткани для химических агентов определяется структурой ткани, которая может изменяться в результате протекания патологических процессов, таких как гликирование, то характер и скорость диффузии агента в биотканях будет отражать изменение их структуры, что может быть использовано в качестве биомаркера степени гликированности биоткани.

Метод «оптического просветления» биологических тканей (Tuchin V.V., 2009), в котором снижение рассеяния света во времени определяется скоростью диффузии химических агентов, так называемых оптических просветляющих агентов (ОПА), в тканях, может быть использован для количественного определения этой скорости. Хорошо известно, что биоткани обладают достаточно сильным рассеянием света в видимом и ближнем ИК-диапазоне длин волн вследствие неоднородностей показателя преломления на границах клеточных органелл, липидных капель, мембран и белковых волокнистых структур, составляющих ткани, что и определяет относительно неглубокое проникновение света в ткань с перераспределением падающих пучков света по всем направлениям. Введение в биоткань биосовместимых иммерсионных

жидкостей (ОПА) и частичное замещение ими ВТЖ приводит к выравниванию показателей преломления компонентов ткани, и, следовательно, к снижению рассеяния биоткани, что является одним из основных механизмов оптического просветления дисперсных сред, включая биоткани.

К сожалению, в настоящее время в литературе недостаточно данных о процессах диффузии иммерсионных жидкостей в тканях при развитии диабета. Помимо этого, недостаточно исследована и диффузия некоторых иммерсионных жидкостей в коже и миокарде, что само по себе представляет интерес для развития методов оптической томографии, микроскопии высокого разрешения и оптимизации методов целевого воздействия на тканевые структуры, включая злокачественные новообразования. Решение вышеописанных проблем и вопросов актуально, что и определило цель настоящей диссертационной работы.

Целью диссертационной работы является экспериментальное исследование диффузии химических агентов в здоровых и диабетических биотканях с помощью оптических методов мониторинга.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Исследование кинетики оптического просветления диабетических и недиабетических биологических тканей *in vitro* и *ex vivo* под действием различных биосовместимых гиперосмотических иммерсионных агентов.
2. Исследование геометрических изменений образцов биологических тканей при оптическом просветлении *in vitro*.
3. Определение коэффициентов диффузии гиперосмотических иммерсионных агентов в диабетических и недиабетических биологических тканях, таких как кожа и сердечная мышечная ткань, из измерений кинетики их оптического просветления.
4. Сравнительный анализ оптических и диффузионных свойств диабетических и недиабетических биологических тканей *ex vivo*.
5. Исследование оптического просветления кожи *in vivo* под действием различных биосовместимых гиперосмотических иммерсионных агентов. Определение коэффициентов диффузии иммерсионных агентов в коже *in vivo*.

Научная новизна работы

- Исследована кинетика изменения оптического коллимированного пропускания, веса, толщины и площади образцов сердечной мышечной ткани свиньи *ex vivo* во время их оптического просветления растворами глюкозы и глицерина.
- Впервые измерены коэффициенты диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышечной ткани свиньи *ex vivo*.
- Исследована кинетика изменения оптического коллимированного пропускания, веса, толщины и площади образцов кожи крысы *ex vivo* во время их оптического просветления растворами глюкозы, ПЭГ-300, ПЭГ-400, рассчитаны коэффициенты диффузии глюкозы, ПЭГ-300, ПЭГ-400, «Омнипак®» (активное вещество – йогексол, 300 мг йода/мл) в коже крысы *ex vivo*.
- Исследована кинетика изменения веса, толщины и площади образцов кожи мыши *ex vivo* во время их оптического просветления растворами глюкозы разной концентрации.
- Исследовано изменение кинетики оптического коллимированного пропускания во время оптического просветления кожи *ex vivo* здоровых мышей (с нормальным уровнем глюкозы в крови) и мышей с привитым аллоксановым диабетом

растворами глюкозы разной концентрации. Измерены коэффициенты диффузии иммерсионных агентов в диабетической и недиабетической коже *ex vivo*. Показано, что коэффициент диффузии глюкозы существенно меньше в диабетической коже по сравнению со здоровой.

- Исследовано изменение кинетики оптического коллимированного пропускания во время оптического просветления кожи и сердечной мышечной ткани *ex vivo* крыс с привитым аллоксановым диабетом и крыс контрольной группы раствором глицерина. Рассчитаны коэффициенты диффузии глицерина в диабетической и недиабетической коже и сердечной мышечной ткани *ex vivo*. Показано, что диффузия глицерина затруднена в диабетической коже и сердечной мышечной ткани по сравнению со здоровыми тканями. Впервые обнаружена корреляция в поведении оптического просветления и диффузии молекул глицерина для миокарда и кожи крысы.
- С помощью оптической когерентной томографии исследовано оптическое просветление кожи человека *in vivo* под действием различных биосовместимых гиперосмотических двух- и многокомпонентных растворов: водного 40%-раствора глюкозы, раствора фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%), водного 60%-раствора глицерина, раствора глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%), рентгеноконтрастного раствора «Омнипак» (йогексола). Определены коэффициенты диффузии химических агентов в коже человека *in vivo*.

Научная и практическая значимость работы

Результаты работы дают основания для дальнейших научных исследований диффузионных свойств ОПА в различных биологических тканях при диабете. По полученным результатам подана заявка на патент №2016102046 от 22.01.2016 на изобретение «Способ для неинвазивного оптического мониторинга патологии тканей жизненно важных органов при сахарном диабете и биосенсор для его реализации». Данные исследования могут способствовать созданию неинвазивного метода мониторинга ранних диабетических изменений в тканях организма. Измеренные коэффициенты проницаемости и скорость диффузии химических агентов в исследованных биотканях могут дать информацию о степени их гликированности, что позволит экстраполировать наличие патологических изменений в недоступных для прямого анализа биологических тканях (тканях почки, ретине, миокарде, скелетных мышцах, тканях мозга и пр.), осуществить мониторинг патологических нарушений при развитии сахарного диабета, определять стадию заболевания и состояние организма при лечении заболевания на длительном интервале времени.

Результаты также способствуют дальнейшему развитию метода оптического просветления биотканей, применяемого для управления оптическими параметрами тканей для повышения эффективности диагностики и терапии различных заболеваний оптическими методами.

Основные результаты и положения, выносимые на защиту:

1. Модифицированная методика определения коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биологических тканях *in vitro*, основанная на измерении временных зависимостей коллимированного пропускания образцов и математической модели, учитывающей изменение показателя преломления компонентов ткани, изменение геометрических параметров исследуемых образцов (толщины, площади), вызванных сжатием или набуханием ткани. Значения коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышце свиньи, а

также глюкозы, глицерина, ПЭГ-300, ПЭГ-400 и йогексола (Омнипак®) в коже крысы.

2. Для аллоксановой модели диабета у мышей в экспериментах *ex vivo* установлено, что при воздействии водных 30%-, 43%-, 56%-растворов глюкозы на кожу коэффициент диффузии глюкозы в коже в 1.5-2.5 раза меньше, чем у мышей контрольной группы. Установлено, что при воздействии 70%-раствора глицерина на кожу и сердечную мышцу крыс *ex vivo* коэффициент диффузии глицерина в биотканях в 1.2 и 1.5 раза меньше, соответственно, чем у крыс контрольной группы.
3. Воздействие рентгеноконтрастного раствора «Омнипак» (йогексола) на кожу человека *in vivo* вызывает эффект оптического просветления кожи. Значения коэффициентов диффузии глюкозы, глицерина, йогексола (Омнипак®) в коже человека *in vivo*.

Личный вклад автора диссертации

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных данных, анализе и обсуждении полученных результатов, в написании научных статей и апробации результатов исследований на конференциях, симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, использованием апробированных моделей и методов измерения, согласованностью с результатами независимых исследований других авторов, широкой апробацией результатов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 17 международных и российских мероприятиях, в том числе: на XVI, XVII, XVIII, XIX, XX международных школах для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting - SFM» (Саратов, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016), Russian-Chinese Workshop on Biophotonics and Biomedical Optics (Саратов, 2012), Asia Communications and Photonics Conference (Китай, 2012), The National Biophotonics and Imaging Platform Ireland (Ирландия, 2013), The 11th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (Китай, 2013), The 5th Biophotonics and Imaging Graduate Summer School (Ирландия, 2014), ежегодной всероссийской научной школе-семинаре «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, 2014), ежегодной всероссийской молодежной Самарской конкурс-конференции научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, 2014, 2015), всероссийской научной школе-семинаре «Взаимодействие СВЧ, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами» (Саратов, 2015), всероссийской молодежной научной школе-конференции «Практическая биофизика» (Саратов, 2015), 3 летней школе «Photonics Meets Biology» (Греция, 2015), International Symposium “Fundamentals of Laser Assisted Micro- and Nanotechnologies” (FLAMN-16), Saint-Petersburg, Russia.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 17 работ, из которых 8 – в реферируемых изданиях, 2 научных статьи – в рецензируемых журналах из списка ВАК, 7 статей – в трудах российских и международных конференций.

Конкурсная поддержка работы

Исследования были поддержаны грантами Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ НШ-1177.2012.2, НШ-703.2014.2, НШ-7898.2016.2; грантами РФФИ 13-02-91176-ГФЕН_а, № 14-02-00526-14; грантами РНФ №14-15-00186, №14-15-00128; грантом Правительства РФ №14.Z50.31.0004, программой «УМНИК» (договор №4247ГУ1/2014 от 16.12.2014 г., №9084ГУ2/2015 от 24.12.2015 г.)

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка цитируемой литературы, состоящего из 276 наименований. Диссертация изложена на 121 странице, содержит 25 рисунков, 23 таблицы, 38 формул.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность исследований, изложены цель, задачи исследований, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященный описанию структуры, оптических свойств кожи и сердечной мышечной ткани при отсутствии и наличии заболевания сахарным диабетом, гликирования. Описаны причины и последствия развития сахарного диабета в отношении биологических тканей, а также методы и результаты их исследования. Рассмотрены принципы оптического просветления биологических тканей с использованием иммерсионных жидкостей, выполнен анализ применения различных веществ в качестве иммерсионных жидкостей. Проанализированы методы измерения и определения проницаемости биологических тканей для различных химических веществ.

Во **второй главе** представлены результаты исследования диффузии глюкозы и глицерина в сердечной мышце *in vitro*, глюкозы, ПЭГ-300, ПЭГ-400, йогексола («Омнипак®») 300 мг йода/мл) в коже *ex vivo*. Получена кинетика изменения коллимированного пропускания, веса, толщины, площади и объема образцов свиного миокарда при оптическом просветлении 40%-раствором глюкозы и водным 60%-раствором глицерина, а также кинетика изменений соответствующих параметров образцов крысиной кожи при оптическом просветлении 40%-раствором глюкозы, ПЭГ-300, ПЭГ-400. Получена кинетика изменения коллимированного пропускания образцов кожи *ex vivo*, помещенных в «Омнипак» (активное вещество - йогексол).

Оптические просветляющие агенты и исследуемые образцы

Показатели преломления ОПА измерялись на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (ATAGO, Япония) на 12-ти длинах волн в диапазоне от 450 до 1550 нм (табл. 1). Спектральные зависимости показателей преломления ОПА использовались в расчетах коэффициентов диффузии ОПА в биологических тканях.

Таблица 1. Показатели преломления ОПА на разных длинах волн.

λ , нм	450	480	486	546	589	644	656	680	930	1100	1300	1550
60%-раствор глицерина	1.4211	1.4203	1.4200	1.4166	1.4140	1.4131	1.4125	1.4107	1.4067	1.4038	1.3971	1.3951
40%-раствор глюкозы	1.3982	1.3956	1.3953	1.3921	1.3909	1.3885	1.3884	1.3869	1.3819	1.3795	1.3736	1.3699
ПЭГ-300	1.4709	1.4685	1.4682	1.4650	1.4631	1.4610	1.4604	1.4596	1.4559	1.4544	1.4501	1.4460
ПЭГ-400	1.4733	1.4708	1.4706	1.4670	1.4649	1.4633	1.4627	1.4620	1.4581	1.4567	1.4526	1.4483

Экспериментальная установка и методы измерения

С помощью многоканального спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США) проводилось измерение спектров коллимированного пропускания образцов биотканей. Образец ткани закреплялся на пластиковой пластине с отверстием в центре и помещался в стеклянную кювету с ОПА. Кювета устанавливалась между двумя волоконно-оптическими кабелями QR400-1-UV-VIS (Ocean Optics, США) с внутренним диаметром 400 мкм с коллиматорами 74-ACR (Ocean Optics, США). Галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США) использовалась в качестве источника излучения. Кинетика изменения коллимированного пропускания образца регистрировалась путем последовательной записи спектров коллимированного пропускания в диапазоне 500-900 нм каждые 2-10 минут в течение 1.5-2 часов. Все измерения проводились при комнатной температуре (~20°C). В случае применения «Омнипака» (300 мг йода/мл) измерения проводились в ближнем ИК спектральном диапазоне 900-2150 нм с помощью спектрометра NIRQUEST 512-2.2 (Ocean Optics, США).

Кинетика коллимированного пропускания образцов кожи была использована для получения коэффициентов (степени) эффективности оптического просветления образцов биотканей, коэффициентов диффузии ОПА в биотканях, коэффициентов проницаемости биологических тканей для ОПА и характеристического времени диффузии ОПА в ткани.

Характеристическое время диффузии ОПА в ткани τ получали путем аппроксимации временных зависимостей коллимированного пропускания образцов биотканей $T(t)$ уравнением $T(t) = (T_{\max} - T_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + T_0$, где T_0 и T_{\max} - начальное и максимальное значение коллимированного пропускания образца биоткани. Степень (эффективность) оптического просветления образцов оценивалась как $OC_{\text{eff}} = \frac{\mu_{s0} - \mu_{s\min}}{\mu_{s0}}$, где μ_{s0} и $\mu_{s\min}$ - начальное и минимальное значения коэффициента рассеяния кожи.

Измерение геометрических параметров образцов биотканей при оптическом просветлении

Образцы свиного миокарда *in vitro* использовались для выявления кинетики изменения их веса, толщины, площади и объема во время иммерсии в 40%-растворе глюкозы и 60%-растворе глицерина. Образцы кожи *ex vivo* использовались для исследования кинетики изменения их веса, толщины, площади и объема во время иммерсии в 40%-растворе глюкозы, ПЭГ-300 и ПЭГ-400.

Сначала производились измерения веса и толщины, а также регистрация изображения интактного образца биоткани с помощью цифровой фотокамеры, затем образец помещался в ОПА на 5 минут, после чего вновь производились измерения и запись. Измерения продолжались в течение 2 часов.

Для вычисления площади образца изображение обрабатывалось с помощью специальной программы. Число пикселей, занимаемых образцом (со значениями, отличными от 255), подсчитывалось и переводилось в квадратные миллиметры с помощью уравнения $S = \frac{F(H_s)}{\text{cols}(H_s) \cdot \text{rows}(H_s)} \cdot \frac{\text{rows}(H) \cdot z^2}{\text{cols}(H)}$, где F - функция, рассчитывающая число пикселей, занимаемых образцом, cols - количество колонок, rows - количество строк, H - первоначальное изображение, H_s - изображение образца на белом фоне, z - ширина изображения.

Результатом аппроксимации кинетики изменения веса $w(t)$ образца кожи является кинетика дегидратации образца, «продольное сжатие» оценивалось из кинетики изменения площади $s(t)$ образца, «поперечное сжатие» - из измерений толщины $l(t)$ образца. Полученные временные зависимости толщины, веса и площади образцов кожи, иммерсированных в ПЭГ-300 и ПЭГ-400, аппроксимировались уравнением $A_{norm}(t) = \frac{A(t)}{A(t=0)} = A_D \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) + y_0$, где $A_{norm}(t)$ - нормированное значение толщины, площади или веса образца, $A(t=0)$ и $A(t)$ - значение измеренного параметра в начальный момент времени $t=0$ и в момент времени t соответственно, A_D - константа, характеризующая максимальную степень дегидратации/сжатия образца, τ_D - характеристическое время дегидратации/сжатия образца, y_0 характеризует остаточное значение веса, площади, толщины или объема образца после дегидратации.

Поскольку для некоторых иммерсионных агентов после уменьшения измеряемых параметров наблюдается набухание образцов биотканей при их иммерсии в ОПА, уравнение аппроксимации такой кинетики включает в себя две части, одна из которых представляет собой кинетику дегидратации образца биоткани, а вторая - кинетику набухания образца. Полученные временные зависимости толщины, веса и площади образцов миокарда, помещенных в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина, и образцов кожи, иммерсированных в 40%-раствор глюкозы, аппроксимировались уравнением $B_{norm}(t) = \frac{B(t)}{B(t=0)} = A_D \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_w}\right) + B_S \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_g}\right)\right) + y_0$, где $B(t)$ и $B(t=0)$ - значение измеренной величины в момент времени t и $t=0$ соответственно, A_D и B_S - максимальная степень дегидратации/сжатия и набухания образца, соответственно, τ_w - характеристическое время диффузии воды, τ_g - характеристическое время диффузии агента, y_0 - наименьшее значение параметра, которое может быть достигнуто.

Полученные временные зависимости геометрических параметров образцов биотканей использовались при оценке коэффициентов диффузии ОПА в биотканях, в том числе для учета изменений объема образца $V(t)$ и объемной доли рассеивателей $\varphi_s(t)$.

Метод определения коэффициентов диффузии гиперосмотических химических агентов в биологических тканях in vitro, ex vivo

С большой степенью достоверности фиброзные ткани (и в особенности внутритканевый матрикс этих тканей) могут быть представлены как полиэлектролитные гели (Березов Т.Т., 1998, Huang Y., 1999, Равич-Щербо М.И., 1975, Culav E.M., 1999). Согласно данному подходу, подвижность молекул в бинарных системах характеризуется парциальными коэффициентами самодиффузии молекул растворителя (воды) и молекул растворенного вещества (ОПА). При этом потоки молекул растворителя и растворенного вещества взаимодействуют друг с другом, и соответствующие коэффициенты диффузии называются связанными друг с другом коэффициентами взаимодиффузии (Малкин А.Я., 1979, Чалых А.Е., 1987). К сожалению, в настоящее время, не существует надежных методов отдельного измерения этих коэффициентов или они могут быть измерены только в отдельных частных случаях. В этом случае при анализе диффузии высококонцентрированных

веществ в биотканях можно говорить об относительном коэффициенте диффузии, характеризующем среднюю скорость обменного потока ОПА в биоткань и воды из биоткани.

Используемый метод оценки коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биологические ткани (Tuchin V.V., 2009) основан на восстановлении значения коэффициента диффузии по кинетике изменения коллимированного пропускания образца биоткани *in vitro*, помещенного в ОПА, путем минимизации

целевой функции $f(D, t) = \sum_{i=1}^{N_i} (T_c^{teor}(D, t_i) - T_c^{exp}(t_i))^2$, где $T_c^{teor}(D, t_i)$ и $T_c^{exp}(t_i)$ –

рассчитанный и экспериментально измеренный коэффициент пропускания в момент времени t , сек, N_i – количество экспериментальных точек временной зависимости коллимированного пропускания образца биоткани на определенной длине волны, D – относительный коэффициент диффузии ОПА, $см^2/сек$.

Для теоретических расчетов кинетики изменения коэффициента коллимированного пропускания образца биоткани используется алгоритм, определяющий зависимость коэффициента коллимированного пропускания образца от концентрации ОПА внутри него. Временная зависимость коллимированного пропускания образца $T_c^{teor}(\lambda, t)$ при оптическом просветлении определяется законом Бугера-Ламберта $T_c^{teor}(\lambda, t) = \exp[-(\mu_a(t) + \mu_s(\lambda, t)) \cdot l(t)]$, где $\mu_a(\lambda, t)$ и $\mu_s(\lambda, t)$ – кинетика изменения коэффициента поглощения и рассеяния образца биоткани, соответственно, $см^{-1}$, $l(t)$ – кинетика изменения толщины образца, $см$, λ – длина волны, $нм$.

Оптическая модель образца фиброзной биоткани представляется в виде пластины толщиной l , состоящей из цилиндров, упакованных параллельно плоскостям поверхностей пластины и помещенных в базовое вещество. Так как показатели преломления цилиндров и базового вещества отличаются, имеет место рассеяние света. Рассеяние света рассматривается в рамках теории Ми. Коэффициент рассеяния образца биоткани оценивается по следующей формуле

$\mu_s(\lambda, t) = \frac{\varphi_s(t)}{\pi a^2} \cdot \sigma_s(\lambda, t) \cdot \frac{(1 - \varphi_s(t))^3}{1 + \varphi_s(t)}$, где $(1 - \varphi_s(t))^3 / (1 + \varphi_s(t))$ – фактор упаковки рассеивателей, $\sigma_s(\lambda, t)$

– сечение рассеяния частицы, $см$, определяемое по формуле

$\sigma_s(\lambda, t) = \frac{\pi^2 a \cdot x^3(\lambda, t)}{8} (m^2(\lambda, t) - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2(\lambda, t) + 1)^2} \right)$, где $m(\lambda, t) = n_s(\lambda) / n_1(\lambda, t)$ – отношение

показателей преломления рассеивающих волокон $n_s(\lambda)$ и окружающей их среды (ВТЖ) $n_1(\lambda, t)$, $x(\lambda, t) = 2\pi a n_1(\lambda, t) / \lambda$ – относительный размер рассеивателей.

Временную зависимость показателя преломления ВТЖ $n_1(\lambda, t)$ можно найти из закона Гладстона-Далля, для двухкомпонентных растворов $n_1(\lambda, t) = n_{10}(\lambda) \cdot (1 - C(t)) + n_{OCA}(\lambda) \cdot C(t)$, где $n_{OCA}(\lambda)$ – показатель преломления ОПА, $n_{10}(\lambda)$ – зависящий от длины волны показатель преломления ВТЖ в начальный момент времени $t = 0$.

Задача оценки скорости диффузии решается в рамках модели свободной диффузии с учетом изменения фактора упаковки рассеивателей и наличия встречного потока воды, что выражается в виде среднего значения относительного коэффициента диффузии. Площадь нижней и верхней поверхностей образца значительно превышает площадь боковых сторон образца, поэтому можно пренебречь краевыми эффектами и решать одномерную задачу диффузии.

Кинетика изменения концентрации ОПА, усредненная по объему образца, для односторонней диффузии может быть представлена уравнением $C(t) = C_0 \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \exp\left(- (2i+1)^2 t \frac{\pi^2 D}{4l^2}\right) \right)$, для двухсторонней диффузии уравнение имеет вид $C(t) = C_0 \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \exp\left(- (2i+1)^2 t \frac{\pi^2 D}{l^2}\right) \right)$.

Характеристическое время диффузии τ , сек, в первом случае определяется как $\tau = 4l^2 / \pi^2 D$, во втором случае выражается как $\tau = l^2 / \pi^2 D$.

Коэффициент проницаемости биотканей P , см/сек, в случае односторонней и двухсторонней диффузии вычисляется с помощью выражений $P = D/l$ и $P = \pi^2 D/l$, соответственно.

Исследование кинетики изменения геометрических свойств биотканей при оптическом просветлении гиперосмотическими химическими агентами

Было получено, что вес, толщина, площадь и, следовательно, объем образцов миокарда снижаются приблизительно через 5-15 минут после помещения образцов в 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина (рис. 1, 2), затем все величины начинают увеличиваться и практически во всех случаях достигают насыщения.

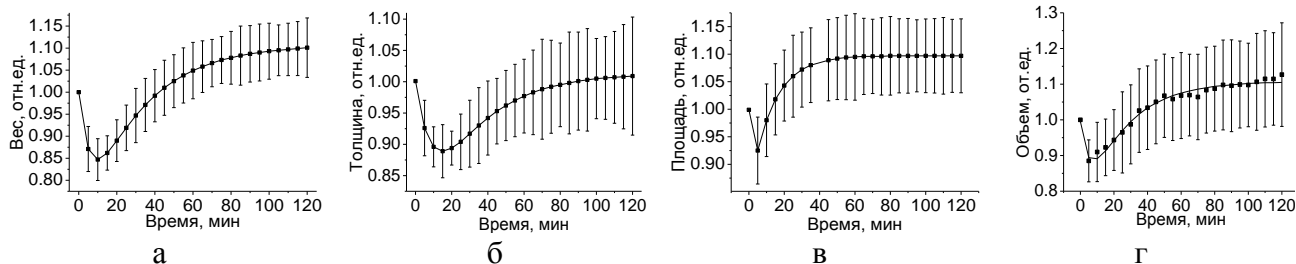


Рисунок 1. Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема (г) образцов миокарда во время их иммерсии в 40%-растворе глюкозы

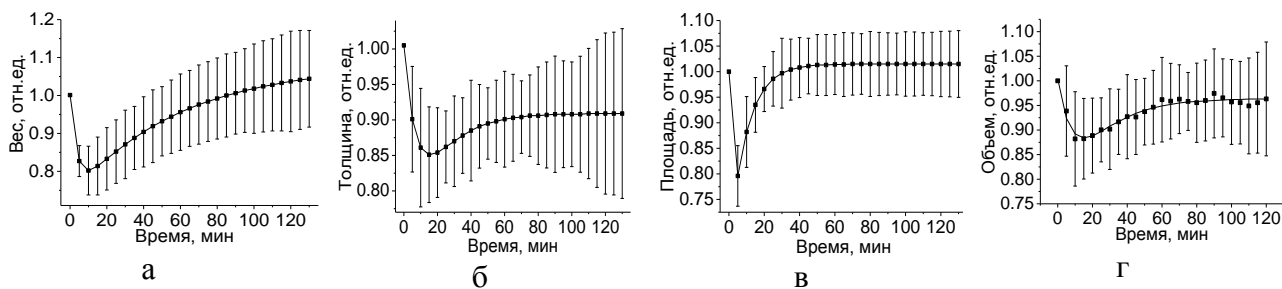


Рисунок 2. Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема образцов миокарда во время их иммерсии в 60%-растворе глицерина

Полученные зависимости веса, толщины, площади и объема образцов кожи от времени воздействия 40%-раствора глюкозы, усредненные по всем исследуемым образцам, представлены на рисунке 3. Все параметры начинают снижаться сразу же после помещения образцов в раствор глюкозы, далее наблюдается последующее незначительное увеличение веса образцов, а также поперечное и продольное набухание образцов кожи.

На рисунке 4 представлена кинетика изменения веса, толщины, площади и объема образцов кожи крысы, помещенных в ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Все геометрические параметры снижаются при воздействии ПЭГ на кожу.

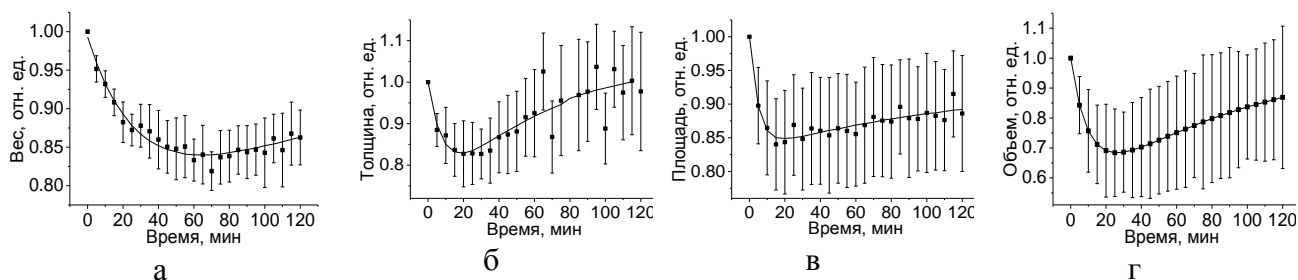


Рисунок 3. Кинетика изменения веса (а), толщины (б) площади (в) и объема (г) образцов кожи *ex vivo* под действием 40%-раствора глюкозы

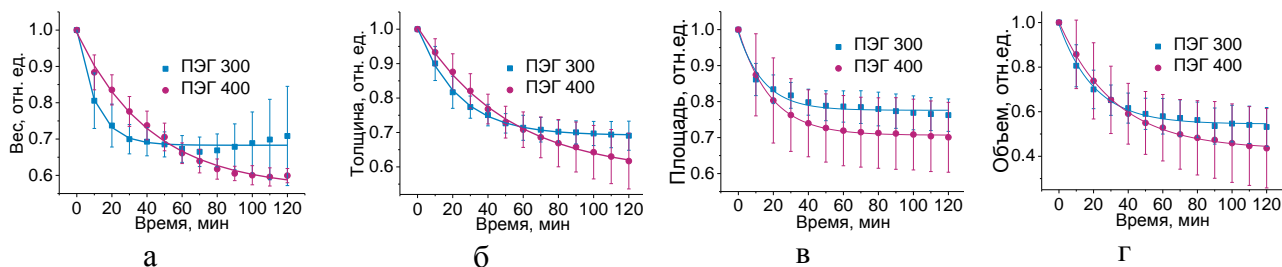


Рисунок 4. Кинетика изменения веса (а), толщины (б), площади (в) и объема (г) образцов кожи во время оптического просветления ПЭГ-300 и ПЭГ-400.

Снижение геометрических параметров объясняется дегидратацией миокарда вследствие его взаимодействия с иммерсионным агентом. Продольное и поперечное сжатие образцов происходит ввиду изменения упаковки волокон ткани, которые сближаются за счет ее дегидратации. Набухание образцов биотканей обусловлено диффузией молекул агентов в ткань миокарда, а также рН раствора, отличным от рН ткани.

Определение коэффициентов диффузии глюкозы и глицерина в миокарде in vitro

Типичные спектры и кинетика коллимированного пропускания образца миокарда, полученные во время его иммерсии в 40%-растворе глюкозы, представлены на рисунке 5. Видно, что образец слабо пропускает свет видимого диапазона в первые минуты измерений, что обусловлено сильным рассеянием света в ткани. После помещения образца в раствор коллимированное пропускание образца начинает расти, приблизительно через 40 минут оптическое просветление замедляется и завершается в исследуемом диапазоне длин волн.

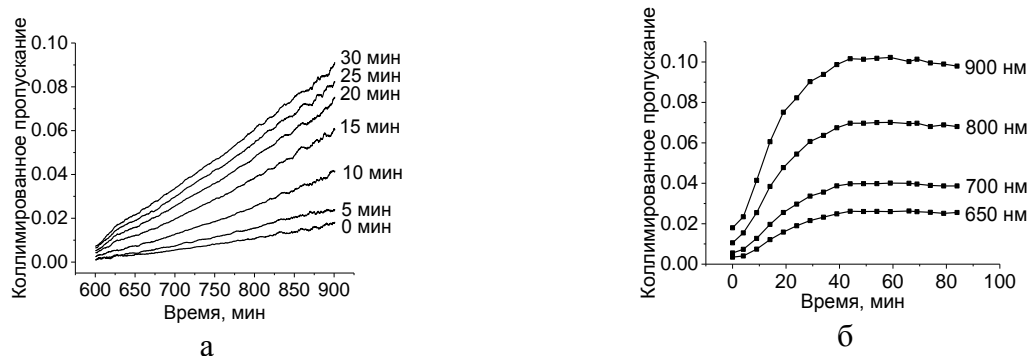


Рисунок 5. а) Спектры коллимированного пропускания образца свиного миокарда, помещенного в 40%-раствор глюкозы, измеренные в разное время, б) Кинетика изменения коллимированного пропускания образца миокарда на разных длинах волн, помещенного в 40%-раствор глюкозы

Кинетика изменения коллимированного пропускания образцов миокарда при воздействии на него 60%-раствора глицерина, а также кожи *ex vivo* под действием ПЭГ-300, ПЭГ-400 и 40%-раствора глюкозы имеет вид, аналогичный представленному на рисунке 5.

Спектры и кинетика изменения коллимированного пропускания образца кожи крысы *ex vivo*, помещенного в «Омнипак», представлены на рисунке 6. В основном эффект оптического просветления локализован в области 1900-2100 нм.

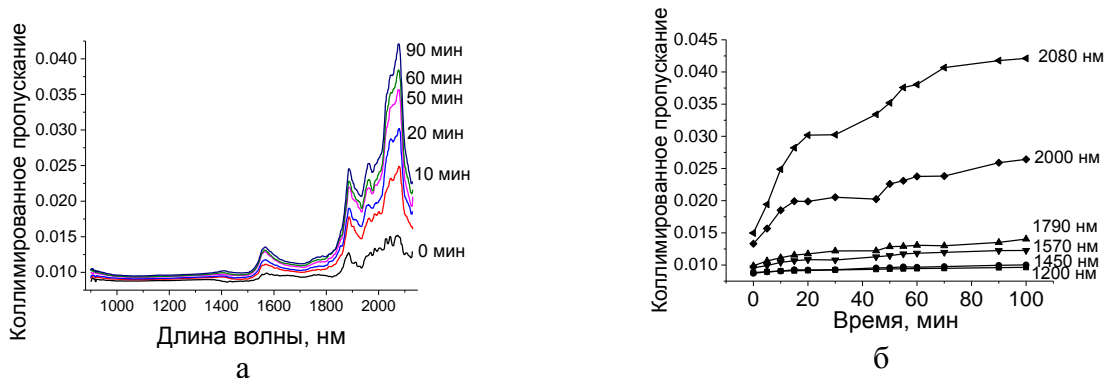


Рисунок 6. Спектры (а) и кинетика изменения (б) коллимированного пропускания образца кожи *ex vivo*, помещенного в «Омнипак®»

Полученные временные зависимости коллимированного пропускания образцов использовались для вычисления коэффициентов диффузии глюкозы, глицерина, ПЭГ-300 и ПЭГ-400, йогексола (Омнипак®) в биотканях. Значения начальной толщины образцов l , коэффициентов диффузии агентов D в тканях, коэффициентов проницаемости тканей P для агентов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Значения начальной толщины образцов, коэффициентов диффузии агентов в тканях, коэффициентов проницаемости тканей для агентов

Биоткань	ОПА	l , см	D , см ² /сек	P , см/сек
Миокард свиньи <i>in vitro</i>	60%-раствор глицерина	0.052 ± 0.006	$(7.71 \pm 4.63) \times 10^{-7}$	$(1.48 \pm 0.91) \times 10^{-4}$
	40%-раствор глюкозы	0.066 ± 0.012	$(4.75 \pm 3.40) \times 10^{-7}$	$(7.45 \pm 6.02) \times 10^{-5}$
Кожа крысы <i>ex vivo</i>		0.056 ± 0.020	$(1.06 \pm 0.88) \times 10^{-6}$	$(1.67 \pm 0.91) \times 10^{-5}$
	ПЭГ-300	0.061 ± 0.017	$(1.83 \pm 2.22) \times 10^{-6}$	$(2.39 \pm 1.94) \times 10^{-5}$
	ПЭГ-400	0.066 ± 0.019	$(1.70 \pm 1.47) \times 10^{-6}$	$(2.73 \pm 2.79) \times 10^{-5}$
	Йогексол (Омнипак®)	0.083 ± 0.023	$(4.36 \pm 3.84) \times 10^{-7}$	$(5.25 \pm 4.62) \times 10^{-6}$

Третья глава посвящена сравнительному анализу диффузии глюкозы в коже мышей с модельным аллоксановым диабетом и мышей контрольной группы *ex vivo*. В качестве оптических просветляющих агентов использовались водные 30%-, 43%- и 56%-растворы глюкозы.

Для каждой концентрации раствора глюкозы были использованы двадцать образцов кожи, десять из них были взяты от контрольных мышей, которым не вводился аллоксан, и десять образцов были взяты от мышей с модельным аллоксановым диабетом. Развитие диабета у мышей было вызвано путем однократной инъекции дозы аллоксана после четырехчасового голодания (212 мг/кг массы тела). Уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены мышей, измеряли после голодания до инъекции аллоксана, на 4-й день после инъекции и в день эксперимента (на 11-й день после инъекции) с помощью глюкометра "Accu-Chek Active". Средние значения уровня свободной глюкозы в крови до введения аллоксана, на 4-й день после

инъекции и в день эксперимента составляли 127 ± 18 , 276 ± 105 и 322 ± 120 мг/дл, соответственно.

Образцы кожи помещались в растворы глюкозы, после чего с помощью спектрометра USB4000-VIS-NIR (Ocean Optics, США) с оптическими волокнами (QP600-2-VIS-NIR, OceanOptics, США) с диаметром сердцевины 600 мкм с коллиматорами 74-UV (Ocean Optics, США) начиналась последовательная запись их коллимированного пропускания каждые 15-60 секунд в течение 6-10 минут в спектральном диапазоне 500-900 нм. Данные коллимированного пропускания образцов кожи использовались для оценки эффективности оптического просветления образцов (табл. 4, рис.7), коэффициентов диффузии глюкозы в коже, коэффициентов проницаемости кожи для глюкозы (табл. 5)

Таблица 4. Эффективность оптического просветления кожи мышей контрольной и диабетической групп

Концентрация раствора глюкозы	OC_{eff}
Контрольная группа	
30%	0.34 ± 0.07
43%	0.52 ± 0.09
56%	0.62 ± 0.04
Диабетическая группа	
30%	0.42 ± 0.06
43%	0.51 ± 0.05
56%	0.53 ± 0.12

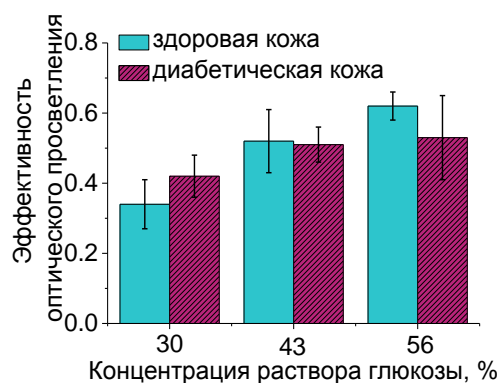


Рисунок 7. Зависимость эффективности оптического просветления образцов кожи мышей контрольной и диабетической групп от концентрации раствора глюкозы

Из таблицы 4 и рисунка 7 видно, что использование растворов с более высокой концентрацией глюкозы приводит к большему оптическому просветлению кожи мышей как контрольной, так и диабетической группы.

В Таблице 5 приведены усредненные экспериментальные данные, полученные для образцов кожи мышей диабетической и контрольной групп: толщина образцов l до и после измерений коллимированного пропускания, коэффициенты диффузии глюкозы в коже, рассчитанные с использованием комплексного алгоритма, учитывающего модель образца биоткани и основанного на восстановлении значения коэффициента диффузии D_{comp} по кинетике изменения коллимированного пропускания образца биоткани, путем минимизации целевой функции, включающей в себя экспериментально полученные и теоретически рассчитанные данные и простого алгоритма, где коэффициент диффузии D_{simpl} вычисляется из экспериментально полученного характеристического времени диффузии; соответствующие коэффициенты проницаемости P_{comp} и P_{simpl} кожи для глюкозы; значения характеристического времени диффузии глюкозы τ .

На рисунке 8 представлены коэффициенты диффузии глюкозы в коже мышей контрольной и диабетической групп, рассчитанные с помощью комплексного и простого алгоритмов, в виде гистограммы. Нужно отметить, что комплексный алгоритм и более простой алгоритм дают близкие результаты и показывают, что при диабете глюкоза диффундирует в коже медленнее (до 2.5 раз), чем в здоровой коже. Из таблицы 5 и рисунка 8 видно, что меньшие значения коэффициента диффузии глюкозы и, соответственно, коэффициента проницаемости кожи для глюкозы были получены для кожи мышей диабетической группы для каждой используемой концентрации раствора. Сильный разброс

значений коэффициента диффузии в случае использования 43%-раствора глюкозы можно объяснить индивидуальными особенностями кожи исследуемой группы мышей. Наиболее явное отличие скорости диффузии глюкозы в коже мышей контрольной и диабетической групп получено при использовании 30%-раствора глюкозы. Более медленная диффузия глюкозы в коже при диабете, полученная в исследовании, возможно, связана с модификацией структуры биотканей в диабетических условиях - изменением упаковки фибрилл, образованием сшивок у белков и изменением содержания свободной и связанной воды в коже.

Таблица 5. Коэффициенты диффузии глюкозы в коже мышей контрольной и диабетической групп, рассчитанные с использованием комплексного и простого алгоритмов, соответственно; соответствующие коэффициенты проницаемости, характеристическое время диффузии; толщина образцов до и после иммерсии кожи в растворах глюкозы

Раствор глюкозы	D_{comp} (см ² /сек) / P_{comp} (см/сек)	D_{simpl} (см ² /сек) / P_{simpl} (см/сек)	τ (мин)	l (см) (до/после)
Контрольная группа				
30%	$(2.87 \pm 1.53) \times 10^{-6} / (1.15 \pm 0.61) \times 10^{-4}$	$(2.60 \pm 1.15) \times 10^{-6} / (1.04 \pm 0.46) \times 10^{-4}$	1.99 ± 1.36	0.027 ± 0.005 / 0.023 ± 0.005
43%	$(2.70 \pm 2.22) \times 10^{-6} / (1.29 \pm 1.06) \times 10^{-4}$	$(2.36 \pm 1.85) \times 10^{-6} / (1.12 \pm 0.88) \times 10^{-4}$	1.88 ± 0.96	0.023 ± 0.005 / 0.019 ± 0.005
56%	$(1.40 \pm 0.96) \times 10^{-6} / (8.24 \pm 5.64) \times 10^{-5}$	$(1.26 \pm 0.86) \times 10^{-6} / (7.41 \pm 5.06) \times 10^{-5}$	2.15 ± 0.88	0.019 ± 0.005 / 0.015 ± 0.005
Диабетическая группа				
30%	$(1.06 \pm 0.55) \times 10^{-6} / (5.43 \pm 2.82) \times 10^{-5}$	$(1.03 \pm 0.44) \times 10^{-6} / (5.28 \pm 2.26) \times 10^{-5}$	2.87 ± 0.68	0.021 ± 0.005 / 0.018 ± 0.005
43%	$(1.15 \pm 0.63) \times 10^{-6} / (5.90 \pm 3.23) \times 10^{-5}$	$(9.10 \pm 5.14) \times 10^{-7} / (4.67 \pm 2.64) \times 10^{-5}$	2.98 ± 1.88	0.020 ± 0.005 / 0.019 ± 0.005
56%	$(1.02 \pm 0.44) \times 10^{-6} / (6.58 \pm 2.84) \times 10^{-5}$	$(8.83 \pm 4.42) \times 10^{-7} / (5.70 \pm 2.85) \times 10^{-5}$	2.80 ± 1.54	0.017 ± 0.005 / 0.014 ± 0.005

Увеличение концентрации раствора приводит к росту эффективности оптического просветления и снижению коэффициента диффузии глюкозы. Это говорит о том, что применение более концентрированных растворов глюкозы позволяет достигнуть более сильного оптического эффекта просветления, но оптическое просветление длится дольше, потому что процесс диффузии занимает больше времени из-за дополнительного воздействия глюкозы на биоткань.

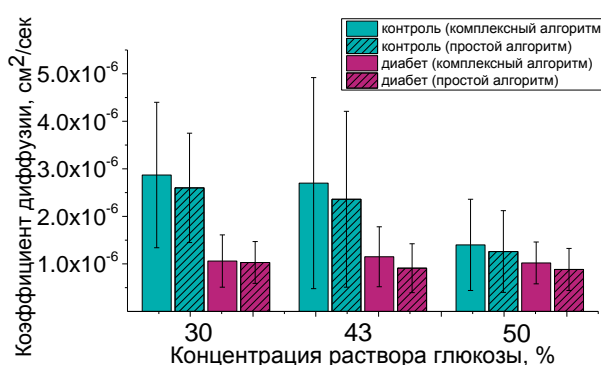


Рисунок 8. Коэффициенты диффузии глюкозы в коже мышей контрольной и диабетической групп, рассчитанные с помощью комплексного и простого алгоритмов

Четвертая глава посвящена сравнительному исследованию диффузионных свойств кожи и миокарда *ex vivo* крыс диабетической и контрольной групп путем определения коэффициентов диффузии глицерина в коже и миокарде *ex vivo*.

В исследованиях использовались образцы кожи и миокарда, взятые от белых беспородных лабораторных крыс. В качестве модели диабета был использован

аллоксановый диабет (однократная внутримышечная инъекция раствора аллоксана (Acros Organic, Belgium) в физиологическом растворе в расчете 10 мг аллоксана на 100 г массы тела крысы). Средние значения уровня свободной глюкозы в крови, измеренные натощак с помощью глюкометра "Accu-Chek Performa" до введения аллоксана, на 7-й день после инъекции и в день эксперимента (на 15-й день после инъекции) составляли 128 ± 18 , 411 ± 131 и 350 ± 147 мг/дл, соответственно. Таким образом, уровень глюкозы в крови увеличился примерно в 3 раза, что характерно для заболевания сахарным диабетом.

В качестве иммерсионного агента использовался водный 70%-раствор глицерина ($n=1.427$). Измерения спектров коллимированного пропускания проводились способом, описанным в главе 2.

В таблице 6 представлены средние значения толщины и веса образцов кожи и миокарда до (l_0 и W_0) и после (l и W) оптического просветления, коэффициентов диффузии (D) глицерина в тканях и коэффициентов проницаемости (P) биотканей для глицерина для крыс контрольной и диабетической групп.

Таблица 6. Средние значения толщины и веса образцов кожи и миокарда до и после оптического просветления, коэффициентов диффузии глицерина в биотканях и коэффициента проницаемости биотканей для глицерина, приведенные для тканей крыс контрольной (к) и диабетической (д) групп.

Ткань	к/д	$l_0/l, \text{см}$	$W_0/W, \text{мг}$	$D, \text{см}^2/\text{сек}$	$P, \text{см}/\text{сек}$
Кожа	к	$0.053 \pm 0.011 / 0.055 \pm 0.013$	$271 \pm 68 / 183 \pm 21$	$(8.33 \pm 2.60) \times 10^{-7}$	$(1.68 \pm 0.88) \times 10^{-5}$
	д	$0.056 \pm 0.004 / 0.057 \pm 0.007$	$270 \pm 32 / 203 \pm 73$	$(6.77 \pm 2.11) \times 10^{-7}$	$(1.20 \pm 0.33) \times 10^{-5}$
Миокард	к	$0.068 \pm 0.011 / 0.051 \pm 0.009$	$210 \pm 37 / 146 \pm 35$	$(7.90 \pm 3.61) \times 10^{-7}$	$(1.18 \pm 0.61) \times 10^{-4}$
	д	$0.058 \pm 0.006 / 0.047 \pm 0.007$	$214 \pm 41 / 153 \pm 36$	$(5.14 \pm 2.10) \times 10^{-7}$	$(8.60 \pm 3.21) \times 10^{-5}$

Снижение веса и толщины образцов кожи и миокарда свидетельствует о дегидратации образцов, которая способствует их оптическому просветлению.

Эффективность оптического просветления биотканей с использованием водного 70%-раствора глицерина продемонстрирована в таблице 7 в виде значений степени оптического просветления образцов на разных длинах волн.

Измеренные коэффициенты диффузии (табл. 6, рис. 9) и проницаемости (табл. 6) принимают меньшие значения для образцов биологических тканей, взятых у крыс с модельным диабетом. Снижение скорости диффузии глицерина в биоткани при диабете может быть связано со структурными изменениями биотканей - изменением упаковки фибрилл, образованием сшивок у белков и изменением содержания свободной и связанной воды в биоткани.

Таблица 7. Средние значения степени оптического просветления образцов кожи и миокарда на разных длинах волн, приведенные для контрольной (к) и диабетической (д) групп

Ткань	к/д	600нм	700 нм	800 нм
Кожа	к	0.58 ± 0.09	0.56 ± 0.04	0.57 ± 0.05
	д	0.60 ± 0.07	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.06
Миокард	к	0.51 ± 0.07	0.59 ± 0.06	0.61 ± 0.07
	д	0.53 ± 0.02	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.06

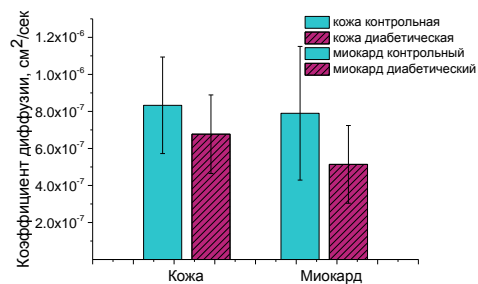


Рисунок 9. Коэффициенты диффузии глицерина в коже и миокарде крыс диабетической и контрольной групп

Такое ухудшение проницаемости ткани (вследствие формирования межфибриллярных сшивок) приводит к нарушению метаболизма, а, следовательно, к развитию более масштабных осложнений у больного сахарным диабетом.

В пятой главе представлены результаты исследования кинетики оптического просветления кожи человека *in vivo* с помощью различных двух- и многокомпонентных химических агентов и измерений коэффициентов диффузии агентов в коже.

В таблице 8 приведены значения показателя преломления n на длине волны 589 нм, осмолярности $Осм$ и рН для ОПА, используемых в исследованиях.

Таблица 8. Значения показателей преломления, вязкости, осмолярности, рН ОПА

ОПА	n	$Осм, осмоль/л$	рН
Водный 40%-раствор глюкозы	1.391	2.22	3
Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%)	1.408	-	7
Водный 60%-раствор глицерина	1.414	12.48	4
Раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%)	1.416	-	6
Омнипак® (йогексол, 300 мг йода/мл)	1.438	0.47	7

Измерения проводились с помощью оптического когерентного томографа Spectral Radar OCT System OCP930SR 022 (Thorlabs Inc., США) на длине волны 930 нм на участке кожи с внутренней стороны предплечья. Запись сканов с исследуемой области проводилась до воздействия иммерсионных агентов, затем каждые 5 минут во время действия агентов, процедура записи повторялась в течение 50 минут. В измерениях участвовало 40 добровольцев, возраст которых составлял 19-21 год.

Аналогично способу, описанному в главе 2, коэффициент диффузии иммерсионной жидкости в коже *in vivo* восстанавливается по кинетике изменения коэффициента ослабления света в исследуемой области при воздействии на ее поверхность ОПА. В данном случае модель кожи представлялась как полубесконечная среда.

На рисунке 10 представлены типичные ОКТ-изображения исследуемых участков кожи до воздействия оптических просветляющих агентов, через 5 и 50 минут после нанесения просветляющего агента и соответствующие зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи.

Полученные временные зависимости коэффициента ослабления света в коже человека *in vivo* при оптическом просветлении иммерсионными агентами использовались для оценки коэффициентов диффузии D иммерсионных агентов в коже, эффективности $ОС_{eff}$ и характеристического времени τ оптического просветления кожи (табл. 9, 10).

На рисунке 10 видно, что после нанесения иммерсионных жидкостей на кожу глубина проникновения зондирующего излучения существенно увеличивается, что объясняется снижением рассеяния света в верхних слоях кожи. В таблицах 9 и 10 можно видеть, что при нанесении каждого из агентов глубина зондирования увеличивается.

На приведенных графиках коэффициент ослабления света снижается после нанесения каждого из использованных оптических просветляющих агентов, что подтверждает снижение рассеяния света в коже. Снижение рассеяния вызвано выравниванием показателей преломления рассеивателей кожи (коллагеновых, эластиновых волокон и клеточных компонентов) и окружающей их внутритканевой

жидкости вследствие диффузии в кожу иммерсионных агентов и частичной дегидратацией ткани за счет осмотических явлений.

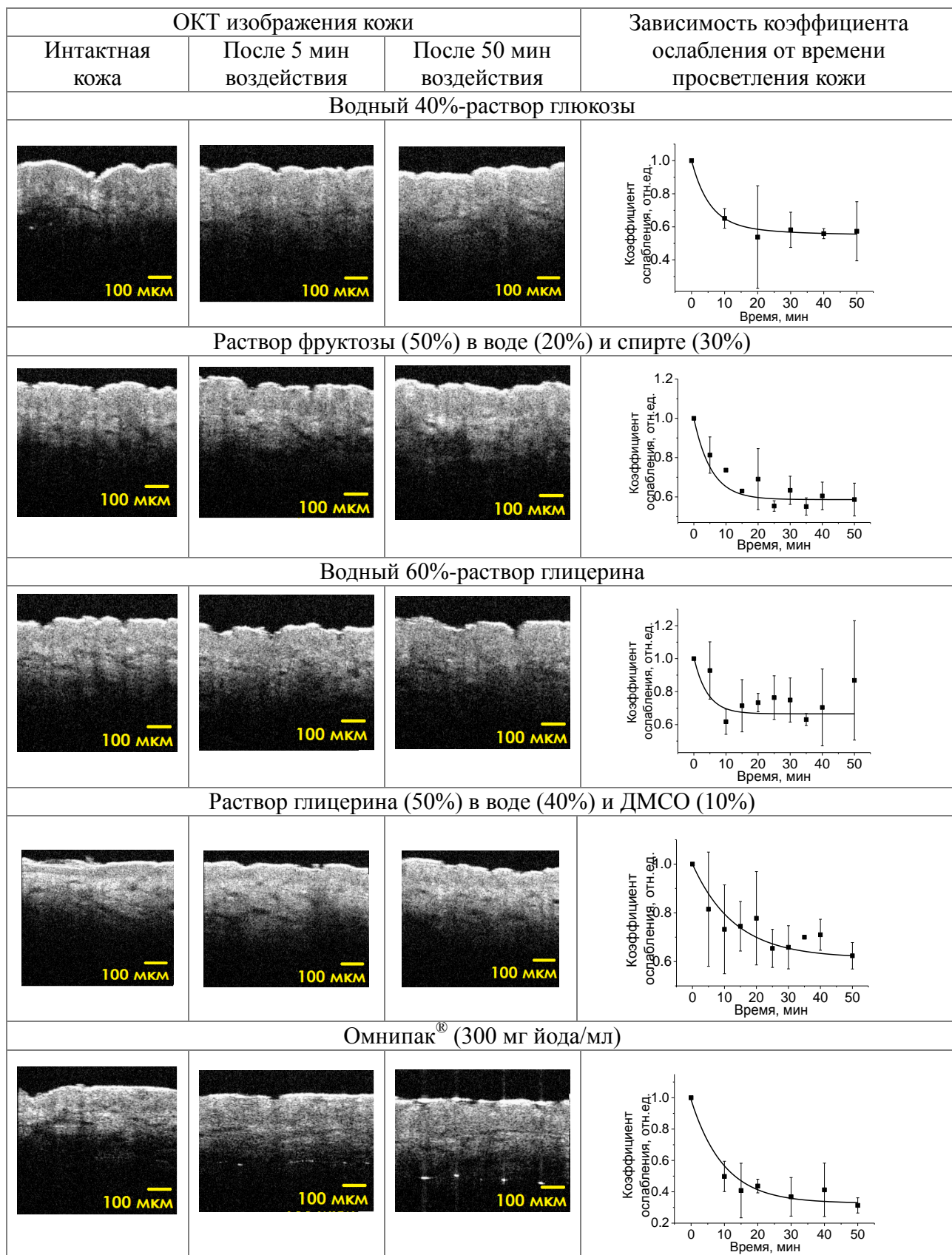


Рисунок 10. ОКТ-изображения интактной кожи, кожи после 5 и 50 минут воздействия просветляющих агентов и соответствующие графики зависимости коэффициента ослабления света от времени просветления кожи

Таблица 9. Эффективность оптического просветления, коэффициент диффузии ОПА в коже человека *in vivo*, увеличение глубины зондирования кожи через 5 и 50 минут после начала ОП (0 мин)

Иммерсионный агент	OC_{eff} (через 50 мин), %	D , см ² /сек	Увеличение глубины зондирования кожи	
			через 5 мин	через 50 мин
Водный 40%-раствор глюкозы	27±11	$(6.69±7.17)×10^{-7}$	в 2 раза	в 3.1 раза
Водный 60%-раствор глицерина	32±08	$(1.46±1.14)×10^{-7}$	в 1.2 раза	в 1.3 раза
Йогексол (Омнипак®)	36±13	$(1.06±0.56)×10^{-7}$	в 1.5 раза	в 3 раза

Таблица 10. Эффективность и скорость оптического просветления кожи человека *in vivo*, увеличение глубины зондирования кожи через 5 и 50 минут после начала ОП (0 мин)

Иммерсионный агент	OC_{eff} (через 50 мин), %	τ , мин	Увеличение глубины зондирования кожи	
			через 5 мин	через 50 мин
Раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%)	41±16	7±2	в 1.6 раза	в 1.2 раз
Раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%)	39±14	7±3	в 2 раза	в 1.5 раз

В каждом случае эффективность и скорость снижения коэффициента ослабления света разная, что связано с различиями в физическо-химических свойствах агентов. Наиболее эффективное оптическое просветление наблюдалось при применении водно-спиртового раствора фруктозы, в то время как самую высокую скорость диффузии имеет глюкоза. Наиболее высокая эффективность раствора фруктозы скорее всего связана с присутствием в растворе спирта, который усиливает проницаемость кожи за счет нарушения поверхностного липидного слоя кожи.

Сравнение эффективности оптического просветления кожи с помощью водного раствора глицерина и водного раствора глицерина с добавлением ДМСО показывает, что при добавлении ДМСО в раствор глицерина увеличивается как эффективность просветления, так и скорость диффузии агента в коже при том условии, что показатели преломления водного раствора глицерина и раствора глицерина в воде и ДМСО практически одинаковы. Большая эффективность водного раствора глицерина при добавлении ДМСО объясняется тем, что ДМСО эффективно разрушает липидный слой эпидермиса кожи и обеспечивает доступ иммерсионного агента в дерму.

Присутствие в составе растворов фруктозы и глицерина усилителей проницаемости в виде спирта и ДМСО, соответственно, также объясняет большие скорости проникновения этих композитных агентов в кожу.

Наименьшая эффективность просветления, вызванная водными растворами глюкозы и глицерина может быть связана с низким относительно внутритканевой жидкости кожи уровнем pH растворов. Это может быть причиной притока воды из соседних областей ткани, а, следовательно, завершения процесса просветления. Также можно связать меньшую эффективность раствора глюкозы с самым низким показателем преломления раствора, который больше всех остальных отличается от показателей преломления коллагена кожи.

Основные результаты и выводы

В ходе работы было показано, что оптическими свойствами сердечной мышцы (миокарда) можно управлять с помощью применения 40%-раствора глюкозы, 60%-раствора глицерина. Впервые были определены коэффициенты диффузии глюкозы и глицерина в миокарде *in vitro*. Также было показано, что оптическими свойствами кожи можно управлять с помощью применения 30%-, 40%, 43%-, 56%-раствора глюкозы, 70%-раствора глицерина, ПЭГ-300, ПЭГ-400, «Омнипак» (300 мг йода/мл). Были определены коэффициенты диффузии данных химических агентов в коже крыс и мышей *ex vivo*.

Были измерены зависимости веса, толщины, площади, объема, коллимированного пропускания образцов миокарда свиньи *in vitro* во время их иммерсии в водном 60%-растворе глицерина и 40%-растворе глюкозы, образцов кожи крысы *ex vivo* во время их иммерсии в 40%-растворе глюкозы, ПЭГ-300 и ПЭГ-400.

Были измерены спектры коллимированного пропускания кожи во время иммерсии в растворе «Омнипак» (300 мг йода/мл).

Из анализа кинетики изменения измеренных величин были оценены степень дегидратации, сжатия и набухания миокарда и кожи, характеристическое время диффузии агентов в исследуемых биотканях, эффективность оптического просветления образцов биотканей, коэффициенты диффузии ОПА в биотканях, коэффициенты проницаемости исследуемых биологических тканей для ОПА. Были получены степень оптического просветления и коэффициент диффузии йогексола («Омнипак») в коже.

Показано, что 40%-раствор глюкозы и 60%-раствор глицерина вызывают набухание биотканей в отличие от ПЭГ-300 и ПЭГ-400, которые не вызывают набухания при достаточно длительном воздействии.

Установлено, что оптическое просветление кожи и миокарда при диабете замедленно по сравнению со здоровой кожей, измеренные коэффициенты диффузии глюкозы меньше в коже при диабете по сравнению с контролем.

Получено, что значение коэффициента диффузии глюкозы в коже уменьшается с увеличением концентрации раствора глюкозы как в диабетической, так и в контрольной группе.

Обнаружена корреляция в поведении оптического просветления и диффузии молекул глицерина для миокарда и кожи крысы, что открывает возможность разработки метода тестирования состояния миокарда по состоянию кожи в процессе развития диабета и его лечения.

Показано, что скорость диффузии глицерина в коже и миокарде меньше при диабете, чем в соответствующих биотканях, полученных от животных контрольной группы.

В результате исследований, проведенных на оптическом когерентном томографе, были получены временные зависимости коэффициентов ослабления света и рассчитаны коэффициенты диффузии иммерсионных агентов в коже человека *in vivo*. Все используемые двух- и многокомпонентные химические агенты, а именно водный 40%-раствор глюкозы, раствор фруктозы (50%) в воде (20%) и спирте (30%), водный 60%-раствор глицерина, раствор глицерина (50%) в воде (40%) и ДМСО (10%), «Омнипак» (йогексол) показали эффект оптического просветления, чем подтвердили возможность их применения в качестве оптических просветляющих агентов в медицинской практике.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Kolesnikov A.S., Kolesnikova E.A., Kolesnikova K.N., **Tuchina D.K.**, Popov A.P., Scaptsov A.A., Nazarov M., Shkurinov A.P., Terentyuk A.G., Tuchin V.V. THz monitoring of the dehydration of biological tissues affected by hyperosmotic agents // *Physics of Wave Phenomena*. — 2014. — V.22, №3. — P.169-176 (ISSN 1934-807X)
2. **Тучина Д.К.**, Генин В.Д., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В., Оптическое просветление тканей кожи *ex vivo* под действием полиэтиленгликоля // *Оптика и спектроскопия*. — 2016. — V.120, №1. — С. 36–45 (ISSN 0030-4034)

Статьи в реферируемых изданиях и журналах:

3. Kolesnikova E.A., Kolesnikov A.S., Genina E.A., Dolotov L.E., **Tuchina D.K.**, Bashkatov A.N., Tuchin V.V. Use of fractional laser microablation of skin for improvement of its immersion clearing // *Proceedings of SPIE*. — 2013. — V.8699, 8699-58. (ISSN 1605-7422, ISBN 9780819489944)
4. Kolesnikov A.S., Kolesnikova E.A., **Tuchina D.K.**, Terentyuk A.G., Nazarov M., Scaptsov A.A., Shkurinov A.P., Tuchin V.V. In-vitro terahertz spectroscopy of rat skin under the action of dehydrating agents // *Proceedings of SPIE*. — 2014. — V.9031. (ISBN 9780819499660)
5. **Tuchina D.K.**, Shi R., Bashkatov A.N., Genina E.A., Zhu D., Luo Q. and Tuchin V.V. *Ex vivo* optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin // *Journal of Biophotonics*. — 2015. — V.8, №4. — P. 273-356. (ISSN 1864-0648)
6. **Tuchina D.K.**, Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V., Quantification of glucose and glycerol diffusion in myocardium // *Journal of Innovative Optical Health Science*. — 2015. — V.8, №3, 1541006. (Print ISSN: 1793-5458; Online ISSN: 1793-7205)
7. **Tuchina D.K.**, Bashkatov A.N., Timoshina P.A., Genina E.A., Tuchin V.V. Study of the optical clearing kinetics of skin using aqueous 40%-glucose solution // *Proceedings of the 5th International Scientific Conference «New Operational Technologies» (NewOT'2015)*, 29–30 September 2015, Tomsk, Russia, AIP Conference Proceedings. — 2015. — V.1688, 030028-6. (ISBN 978-0-7354-1335-1, ISSN 0094-243X)
8. Genin V.D., **Tuchina D.K.**, Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Polyethylene glycol diffusion in *ex vivo* skin tissue // *Proceedings of the 5th International Scientific Conference «New Operational Technologies» (NewOT'2015)*, 29–30 September 2015, Tomsk, Russia, AIP Conference Proceedings. — 2015. — V.1688, 030026-7. (ISBN 978-0-7354-1335-1, ISSN 0094-243X)
9. Genin V.D., **Tuchina D.K.**, Sadeq A.J., Genina E.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N. *Ex vivo* investigation of glycerol diffusion in skin tissue // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2016. — V.2, №1.
10. Feng W., Shi R., Ma N., **Tuchina D.K.**, Tuchin V.V., Zhu D. Skin optical clearing potential of disaccharides // *Journal Of Biomedical Optics*. — 2016. — V.21, №8, 081207. (ISSN 1083-3668)

Работы, опубликованные соискателем в виде тезисов докладов конференций:

11. **Тучина Д.К.**, Хоменко О.В., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление кожи 40%-раствором глюкозы // Проблемы оптической физики и биофотоники: Материалы 14-й Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофотонике. Саратов, Изд-во "Новый ветер", С. 14-20 (2010) (ISBN 978-5-98116-125-4)
12. **Тучина Д.К.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Бучарская А.Б., Терентюк Г.С., Генин В.Д., Баско М.В., Хлебцов Н.Г., Хлебцов Б.Н., Тучин В.В., Кинетика нагрева опухолей и окружающих тканей излучением ближнего ИК спектрального диапазона при введении в ткань золотых нанокмполитов на основе наностержней // Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами: материалы Всероссийской научной школы-семинара/ под ред. проф. Д.А. Усанова. - Саратов: изд-во Саратовский источник, 2014. - 224 с. (ISBN 978-5-91879-422-7)
13. Генин В.Д., **Тучина Д.К.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление тканей кожи *ex vivo* под действием полиэтиленгликоля // Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2014: материалы Международного симпозиума Saratov Fall Meeting 2014 «Оптика и биофотоника - II» / под ред. Г.В. Симоненко, В.В. Тучина – Саратов: Изд-во «Новый ветер», С. 47-55, 2014 (ISBN 978-5-9905584-4-1)
14. **Тучина Д.К.**, Башкатов А.Н., Тучин В.В. *In vitro* исследование влияния глюкозы на скорость диффузии глицерина в коже // XII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов (Самара, 12–15 ноября 2014 г.). – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2014. – 520 с. (ISBN 978-5-902622-27-7)
15. **Тучина Д.К.**, Тимошина П.А., Зюрюкина О.А., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Исследование кинетики оптического просветления кожи человека *in vivo*// // Всероссийская научная школа-семинар «Взаимодействие СВЧ, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами: материалы Всероссийской научной школы-семинара/ под ред. проф. Д.А. Усанова. - Саратов: изд-во Саратовский источник, 2015. - 224 с. (ISBN 978-5-91879-422-7)
16. Генин В.Д., **Тучина Д.К.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А. Исследование диффузии глицерина в тканях кожи *ex vivo* // XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов (Самара, 11–14 ноября 2015 г.). – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, 2015. – 543с. (ISBN 978-5-902622-28-4)
17. Генин В.Д., **Тучина Д.К.**, Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. Оптическое просветление тканей кожи *ex vivo* под действием полиэтиленгликоля-200, Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2015: материалы Международного симпозиума и Международной молодежной научной школы Saratov Fall Meeting 2015 / под ред. Г. В. Симоненко, В. В. Тучина. – Саратов: Изд - во «Новый ветер», 2015. – 212 с. (ISBN 978-5-98116-191-9)