

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ДИФФУЗИИ ГЛЮКОЗЫ В СКЛЕРЕ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2003 г. А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, Ю.П. Синичкин, В.И. Кочубей,
Н.А. Лакодина, В.В. Тучин

Саратовский государственный университет, 410026, Саратов, Московская ул., 155

Поступила в редакцию 04.04.02 г.

После доработки 17.09.02 г.

Выполнена оценка коэффициентов диффузии водных растворов глюкозы в склере глаза человека *in vitro*. Метод основан на регистрации временной динамики изменения коллимированного пропускания образца биоткани под действием биологически совместимых иммерсионных жидкостей. Изменение коллимированного пропускания связано с согласованием показателей преломления рассеивателей склеры и внутритканевой жидкости. Динамику замещения внутритканевой жидкости регистрировали путем последовательной записи спектров коллимированного пропускания в диапазоне 400–800 нм. Для количественного описания процесса замещения предложена диффузионная модель, предполагающая постоянство коэффициента диффузии во всем объеме образца склеры. Представлены результаты экспериментов, выполненных для растворов глюкозы в концентрации 0,18; 0,3 и 0,4 г/мл. Оценка коэффициентов диффузии выполнена путем аппроксимации экспериментальных данных в рамках предложенной модели.

Ключевые слова: диффузия, склера, управление оптическими параметрами биотканей.

Оптическими свойствами биотканей можно эффективно управлять с помощью пропитывания их биологически совместимыми жидкостями [1–5]. При этом основным механизмом управления является оптическая иммерсия – согласование показателей преломления рассеивателей (например, коллагеновых волокон) и внутритканевой жидкости, – возникающая при проникновении в биоткань биологически совместимых иммерсионных жидкостей. Такое управление важно как для выяснения фундаментальных закономерностей метаболизма биотканей, так и при реализации методов оптической и лазерной диагностики, терапии и хирургии [1]. В частности, просветление склеры глаза за счет применения осмотически активных жидкостей важно для трансклеральной хирургии глаза, развития неинвазивных методов оптической томографии глаза и при индикации гомеостаза тканевых жидкостей [5].

Знание коэффициентов диффузии необходимо для построения математических моделей, адекватно описывающих процессы взаимодействия осмотических жидкостей с биотканями. И хотя диффузия многих биологически совместимых жидкостей в водных растворах достаточно хорошо описана [6–8], их диффузия в

биотканях продолжает оставаться малоизученной областью исследований [2,5,8–13].

В настоящей работе выполнена оценка коэффициентов диффузии глюкозы в склере глаза человека на основе *in vitro* экспериментальных исследований оптических свойств склеры глаза человека при воздействии на биоткань водных растворов глюкозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования выполнены с помощью оптического многоканального анализатора ЛЭСА–6мед («БиоСпек», Россия). Схема экспериментальной установки показана на рис. 1. Кювету, заполненную водным раствором глюкозы, с образцом склеры, закрепленном в специальном пластмассовом держателе, помещали между двумя волоконными световодами диаметром 400 мкм и числовой апертурой 0,20. Спектры коллимированного пропускания регистрировали в области 400–800 нм каждые 30 с в течение 10–15 мин с момента помещения образца склеры в раствор глюкозы. Ошибка измерений не превышала 5% от измеряемой величины в диапазоне длин волн выше 500 нм и 10% в более коротковолновой области спектра.

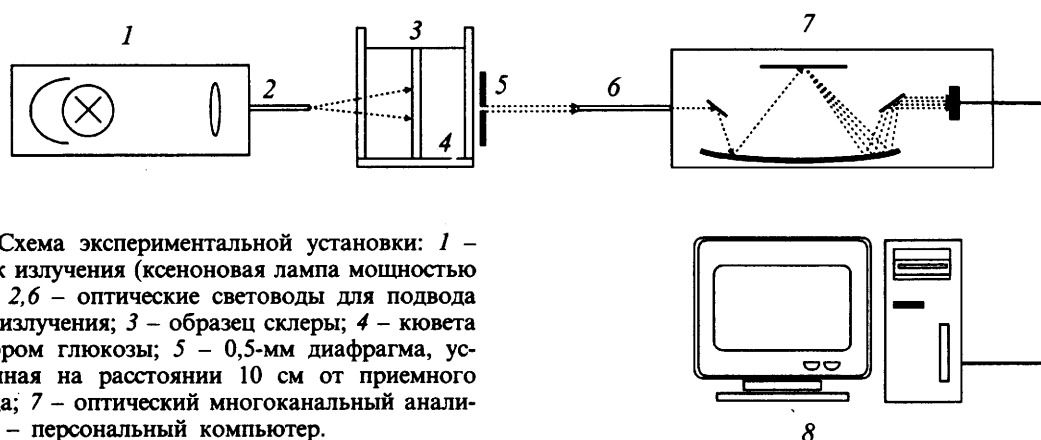


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 - источник излучения (ксеноновая лампа мощностью 250 Вт); 2, 6 - оптические световоды для подвода и сбора излучения; 3 - образец склеры; 4 - кювета с раствором глюкозы; 5 - 0,5-мм диафрагма, установленная на расстоянии 10 см от приемного световода; 7 - оптический многоканальный анализатор; 8 - персональный компьютер.

Водные растворы глюкозы в концентрации 0,18 г/мл (рН 6,32), 0,3 г/мл (рН 5,91), и 0,4 г/мл (рН 5,59) были приготовлены с использованием порошкообразного моногидрата глюкозы («ХимМед», Россия). Измерение показателей преломления растворов было выполнено на рефрактометре Аббе на длине волны 589 нм. Измерения рН растворов проводили на рН-метре HANNA (Португалия).

Образцы склеры были получены методом аутопсии не позднее 24 ч *post mortem*. После аутопсии образцы помещали в 0,9% водный раствор NaCl (рН 6,8) и хранили в нем до проведения экспериментов не более 24 ч при температуре 3°C. Измерения коллимированного пропускания проводили при температуре 20°C. Непосредственно перед проведением экспериментов измеряли толщину образцов размером 1 × 1 см. Результаты измерений представлены в таблице.

Рассеивающие свойства склеры определяются ее структурой и отношением показателей преломления рассеивающих свет неоднородностей (коллагеновых волокон) и внутриканальной жидкости склеры, заполняющей межколлагеновое пространство [3,5].

При исследовании взаимодействия водных растворов глюкозы с образцами склеры мы предполагали, что в результате этого взаимодействия изменяется только показатель прелом-

ления внутриканальной жидкости склеры, вследствие диффузии в биоткань иммерсионной жидкости и осмотического оттока воды из биоткани. При диффузии внутрь биоткани вещества с показателем преломления большим, чем у внутриканальной жидкости, и оттока воды из биоткани происходит согласование показателей преломления рассеивателей и внутриканальной жидкости, что приводит к уменьшению коэффициента рассеяния биоткани. Исследование временной динамики данного процесса позволяет оценить коэффициент диффузии как меру средней скорости обменного потока осмотической жидкости в биоткань и воды из биоткани.

Процесс транспорта глюкозы в склеру глаза описывали в рамках диффузионной теории. Были сделаны следующие допущения относительно процесса переноса: 1) имеет место только концентрационная диффузия, т.е. обменный поток глюкозы в биоткань и воды из биоткани в данной точке пропорционален градиенту концентрации глюкозы в этой точке; 2) коэффициент диффузии постоянен во всех точках внутри исследуемого образца биоткани.

Геометрически образец склеры представлен плоско-параллельной пластиной конечной толщины. Так как площадь верхней и нижней поверхностей пластины намного превышает площадь ее боковых сторон, то можно пренебречь краевыми эффектами и решать одномерную задачу диффузии, т.е. уравнение:

Средние значения коэффициентов диффузии водных растворов глюкозы в склере глаза человека

№	Толщина образца, см	Концентрация раствора, г/мл	Показатель преломления	Коэффициент диффузии, см ² /с
1	0,050 ± 0,001	0,18	1,360	(0,57 ± 0,09)·10 ⁻⁶
2	0,051 ± 0,002	0,30	1,378	(1,47 ± 0,36)·10 ⁻⁶
3	0,048 ± 0,002	0,40	1,390	(1,52 ± 0,05)·10 ⁻⁶

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

где $C(x,t)$ – концентрация глюкозы в склере, г/мл; D – коэффициент диффузии, см²/с; t – время, в течение которого происходит процесс диффузии, с; x – пространственная координата по толщине образца биоткани, см. Поскольку в экспериментах объем раствора глюкозы (≈ 3000 мм³) значительно превышал объем образца склеры (≈ 50 мм³), то соответствующие граничные условия имеют вид:

$$C(0,t) = C(d,t) = C_0,$$

где C_0 – концентрация глюкозы в растворе; d – толщина образца биоткани, см. Начальные условия отражают факт отсутствия глюкозы во всех внутренних точках образца склеры до его инкубации в раствор, т.е. $C(x,0) = 0$.

Решение уравнения диффузии позволяет оценить среднюю концентрацию раствора глюкозы внутри образца в каждый момент времени [8]:

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

что в свою очередь позволяет, воспользовавшись соотношением $n_{gl} = n_{H_2O} + 0,1515C$ [14] для водных растворов глюкозы, где n_{H_2O} – показатель преломления воды [1], C – концентрация глюкозы в растворе, г/мл, оценить временную зависимость показателя преломления внутритканевой жидкости:

$$n_1(t) = n_{10} + 0,1515C(t)/(1 - \varphi),$$

где $n_1(t)$ – показатель преломления внутритканевой жидкости, изменяющийся по мере ее замещения раствором глюкозы; n_{10} – показатель преломления внутритканевой жидкости в начальный момент времени; φ – объемная доля рассеивателей в биоткани, для склеры $\varphi = 0,3$ [5]. Соотношение $C(t)/(1 - \varphi)$ введено для учета пористости образца склеры. Поскольку образцы склеры до проведения экспериментов хранились в 0,9% водном растворе NaCl приблизительно 24 ч, то предполагалось, что к моменту проведения экспериментов в образцах склеры произошло замещение внутритканевой жидкости на раствор NaCl, показатель преломления

которого практически совпадает с показателем преломления воды.

Изменение n_1 приводит к уменьшению коэффициента рассеяния склеры μ_s , которое описывается выражением [5,15]:

$$\mu_s(t) = N\sigma_s(t) = N \frac{\pi^2 a x^3}{8} (m^2 - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2 + 1)^2} \right), \quad (2)$$

где N – число рассеивателей в единице объема; σ_s – сечение рассеяния; $x = 2\pi a n_1 / \lambda$ – параметр дифракции; $m = n_c / n_1$ – относительный показатель преломления рассеивателей; n_c – показатель преломления коллагеновых волокон в склере [16]; a – радиус рассеивателей.

Так как для образца склеры, для длины волны 589 нм, в начальный момент времени, $n_c = 1,474$ [5,16], $n_1 = 1,333$ [1] и $a \approx 50$ нм [5], то можно, вычислив значение сечения рассеяния для данной длины волны, оценить параметр N как отношение экспериментально полученного значения коэффициента рассеяния склеры в начальный момент времени к значению сечения рассеяния на той же длине волны.

Зависимость коэффициента коллимированного пропускания образца склеры, помещенного в раствор глюкозы, от времени имеет вид:

$$T_c(t) = \exp(-(\mu_a + \mu_s(t))d), \quad (3)$$

где μ_a – коэффициент поглощения образца склеры. При расчетах использовали значения коэффициентов поглощения, полученные в работе [17]. Поскольку изменение кислотности внутритканевой жидкости, вследствие ее замещения растворами глюкозы, за время проведения эксперимента вызывает лишь незначительное набухание образца биоткани [18], то изменением толщины образцов пренебрегали.

Уравнения (1)-(3) определяют зависимость коэффициента коллимированного пропускания от концентрации раствора глюкозы внутри образца склеры, т.е. формируют прямую задачу. Обратной задачей в данном случае является восстановление значения коэффициента диффузии по временной динамике коллимированного пропускания. Эта задача была решена путем минимизации следующего целевого функционала:

$$f(D) = \sum_{i=1}^{N_t} (T_c(D, t_i) - T_c^*(t_i))^2, \quad (4)$$

где N_t – общее количество экспериментальных точек, полученное при регистрации временной динамики коллимированного пропускания на

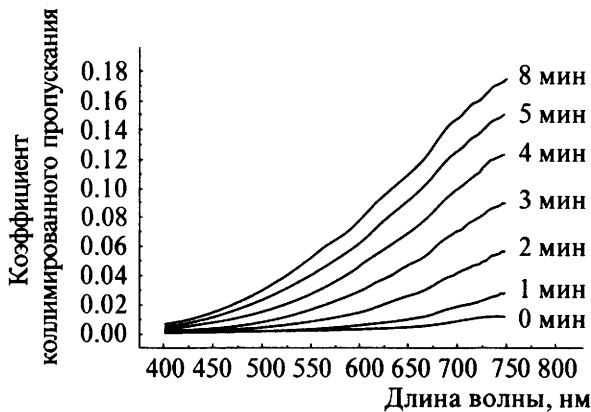


Рис. 2. Временная динамика изменения спектров коллимированного пропускания образца склеры глаза человека, в водном растворе глюкозы с концентрацией 0,4 г/мл.

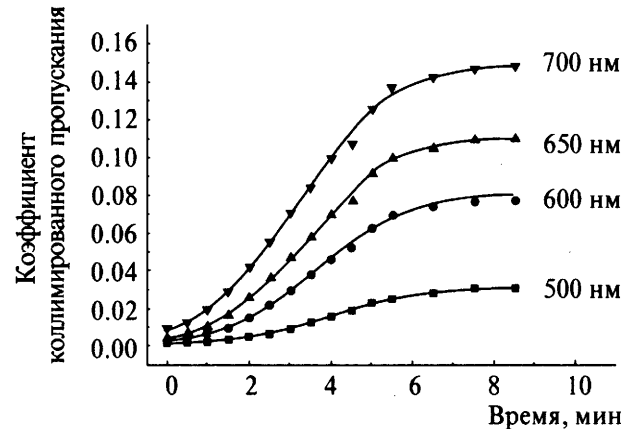


Рис. 3. Временная динамика коллимированного пропускания образца склеры глаза человека, на разных длинах волн, при воздействии на склеру водным раствором глюкозы в концентрации 0,4 г/мл. Точки соответствуют экспериментальным данным, а сплошные линии представляют аппроксимацию экспериментальных данных в рамках предложенной модели.

фиксированной длине волны; $T_c(D, t)$ – значение коэффициента пропускания, рассчитанное по формуле (3) в момент времени t при заданном значении D ; $T_c^*(t)$ – экспериментально измеренное значение коэффициента пропускания в момент времени t .

Для минимизации целевой функции (4) использовали «комплексный» метод [19]. Итерационная процедура повторялась до согласования между собой экспериментальных и расчетных данных. В качестве критерия завершения итерационного процесса использовали условие:

$$\frac{1}{N_t} \sum_{i=1}^{N_t} \frac{|T_c(D, t_i) - T_c^*(t_i)|}{T_c(t_i)} \leq 0,01.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 и 3 представлены спектры и временная динамика коллимированного пропускания на дискретных длинах волн, характеризующие изменение оптических свойств образца склеры под действием водного раствора глюкозы в концентрации 0,4 г/мл. Аналогичное поведение временной динамики коллимированного пропускания наблюдали и при диффузии в склере растворов глюкозы с концентрацией 0,3 и 0,18 г/мл. Из рис. 2 видно, что в начальный момент времени образец склеры представляет мало прозрачную для оптического излучения биоткань. Под действием раствора глюкозы происходит замещение внутриканевой жидкости на раствор глюкозы и, как следствие, уменьшение рассеяния и увеличение коллимированного пропускания. Из представленного рисунка видно, что оптическое просветление образца

склеры происходит во всем видимом диапазоне длин волн с преобладанием просветления в красной области спектра.

Из рис. 3 видно хорошее согласование между экспериментальными данными (точки) и аппроксимирующими кривыми (сплошные линии), рассчитанными в рамках предложенной модели. Незначительные расхождения между экспериментальными и теоретическими данными могут частично объясняться погрешностью экспериментальных измерений и упрощенностью модели, поскольку коэффициент диффузии может несколько меняться в ходе проникновения раствора глюкозы в склеру глаза и образцы склеры неоднородны по объему.

Данные по временной динамике коллимированного пропускания образцов склеры позволили на основе представленного выше алгоритма оценить значения коэффициентов диффузии глюкозы в склере глаза. Вычисления были выполнены для четырех длин волн (500, 600, 650 и 700 нм). Усредненные по длинам волн значения коэффициентов диффузии представлены в таблице. Результаты свидетельствуют о росте коэффициента диффузии глюкозы с увеличением концентрации диффундирующих растворов.

Полученные результаты хорошо согласуются с изначально сделанным предположением о преобладающем влиянии концентрационной диффузии, при которой скорость обменного потока осмотического вещества в биоткань и внутриканевой жидкости из биоткани определяется градиентом концентрации. Полученные

численные значения коэффициентов диффузии меньше значений коэффициента диффузии глюкозы в воде [20], что объясняется сложным структурно-морфологическим строением склеры, затрудняющим диффузию. Следует ожидать, что значения коэффициентов диффузии глюкозы в склере глаза *in vivo* будут несколько большими, поскольку они увеличиваются с увеличением температуры [6,7].

Представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что предложенный метод оценки коэффициентов диффузии, основанный на регистрации изменений оптических свойств биоткани, является перспективным инструментом исследования процессов диффузии различных веществ в биотканях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований «Ведущие научные школы» грант 00-15-96667 и U.S. Civilian Research & Development Foundation for the Independent States of the Former Soviet Union, грант № REC-006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Саратов: Изд-во СГУ, 1998. 384 с.
2. Тучин В.В., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Лакодина Н.А. // Письма в ЖТФ. 2001. Т. 27, № 12. С. 10-14.
3. Максимова И.Л., Зимняков Д.А., Тучин В.В. // Оптика и спектроскопия. 2000. Т. 89, № 1. С. 86-95.
4. Vargas G., Chan K.F., Thomsen S.L., Welch A.J. // *Laser in Surg. and Med.* 2001. V. 29. P. 213-220.
5. Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 4. P. 401-417.
6. Бретинайдер С. Свойства газов и жидкостей. Л.: Химия, 1966. 536 с.
7. Рид Р., Праусниц Дж., Шервуд Т. Свойства газов и жидкостей. Л.: Химия, 1982. 592 с.
8. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М.: Мир, 1980. 341 с.
9. Ярославская А.Н., Ярославский И.В., Отто К., Пунпелс Х.Ж., Душдам Х., Френсен Г.Ф.Ж.М., Хреше Я., Тучин В.В. // *Биофизика*. 1998. Т. 43, вып. 1. С. 125-130.
10. Blank I.H., Moloney J., Emslie A.G., Simon I., Apt C. // *J. Invest. Dermatol.* 1984. V. 82. P. 188-194.
11. Peck K.D., Ghanem Abdel-Halim, Higuchi W.I. // *Pharm. Res.* 1994. V. 11, № 9. P. 1306-1314.
12. Sennhenn B., Giese K., Plamann K., Harendt N., Kolmel K. // *Skin Pharmacol.* 1993. V. 6. P. 152-160.
13. Inamori T., Ghanem A.-H., Higuchi W.I., Srinivasan V. // *Intern. J. Pharmaceutics.* 1994. V. 105. P. 113-123.
14. Maier J.S., Walker S.A., Fantini S., Franceschini M.A., Gratton E. // *Opt. Lett.* 1994. V. 19, № 24. P. 2062-2064.
15. Cox J.L., Farrell R.A., Hart R.W., Langham M.E. // *J. Physiol.* 1970. V. 210. P. 601-616.
16. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. // *Proc. SPIE*. 2000. V. 4162. P. 265-268.
17. Hammer M., Roggan A., Schweitzer D., Muller G. // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 963-978.
18. Пирс А., ван Гейнинген Р. Биохимия глаза. М.: Медицина, 1968. 400 с.
19. Банди Б. Методы оптимизации. М.: Радио и связь, 1988. 128 с.
20. Физические величины: Справочник / Под ред. И.С. Григорьевой, Е.З. Мейлихова. М.: Энергоатомиздат, 1991. 1232 с.

Estimation of the Glucosa Diffusion Coefficient in Human Eye Sclera

A.N. Bashkatov, E.A. Genina, Yu.P. Sinichkin, V.I. Kochubei, N.A. Lakodina, and V.V. Tuchin

Saratov State University, ul. Moskovskaya 155, Saratov, 410026 Russia

The diffusion coefficients of aqueous glucose solutions in human sclera *in vitro* were estimated. The method is based on measurements of time-dependence of collimated transmittance of scleral samples under the action of biocompatible immersion liquids. It was shown that changes in collimated transmittance are connected with the matching between the indices of refraction of scleral scatterers and interstitial fluid. The dynamics of interstitial fluid replacement was registered by recording successively the collimated transmittance spectra in the range of 400-800 nm. For a quantitative description of the replacement process, a diffusion model was proposed, which assumes that the diffusion coefficient is constant throughout the volume of the scleral sample. Experimental results for glucose solutions of concentrations 0.18, 0.3, and 0.4 g/ml are presented. The diffusion coefficients were estimated by approximating the experimental data in the framework of the proposed model.

Key words: diffusion, sclera, control of tissue optical properties