

Диффузия кортексина в склере глаза человека

Э.А.Генина, А.Н.Башкатов, В.В.Тучин, М.Г.Гхосн, К.В.Ларин, Т.Г.Каменских

Исследование диффузии цитаминов, типичным представителем которых является кортексин, в склере является важной задачей при оценке дозы лекарственного препарата, необходимой для достижения достаточной концентрации препарата во внутренних тканях глаза. В настоящей работе скорость диффузии кортексина в склере глаза измерена с помощью методов оптической когерентной томографии (ОКТ) и отражательной спектроскопии. Методика определения коэффициента диффузии основана на регистрации временной зависимости изменения рассеивающих характеристик склеры глаза за счет частичного замещения внутриканальной жидкости водным раствором кортексина, что ведет к снижению уровня ОКТ-сигнала и к уменьшению коэффициента отражения склеры. Значения коэффициентов диффузии кортексина, полученные двумя независимыми оптическими методами, хорошо согласуются между собой.

Ключевые слова: доставка лекарственных препаратов, коэффициент диффузии, отражательная спектроскопия, оптическая когерентная томография.

1. Введение

Использование цитаминов в клинической практике показало высокую эффективность веществ данного класса в различных областях медицины, в том числе в офтальмологии [1–6]. Повышение эффективности лечения больных с патологией сетчатки, а также проблема коррекции метаболических нарушений в зрительном нерве при его частичной атрофии, развивающейся в результате воспаления, интоксикации, нарушения кровообращения, глаукомной оптической нейропатии, относятся к основным задачам современной офтальмологии [4, 5]. Биорегулирующая терапия, основанная на использовании полипептидов (таких как кортексин и ретиналамин), отличается рядом существенных достоинств и, в первую очередь, патогенетической обоснованностью. При любом патологическом процессе происходит нарушение регуляции переноса информационных молекул между клетками, поэтому усиление синтеза регуляторных пептидов в самом организме или введение их извне может способствовать ликвидации патологического процесса и восстановлению утраченных функций [3, 5].

Кортексин – это комплекс L-аминокислот и низкомолекулярных активных полипептидов с молекулярной массой от 1 до 10 кДа, выделенных из коры головного мозга телят или поросят. Основными аминокислотами

являются глутаминовая, аспарагиновая, изолейцин, аланин, глицин и др. Кортексин обладает тканеспецифическим многофункциональным действием на головной мозг. Препарат повышает эффективность энергетического метаболизма клеток мозга, улучшает внутриклеточный синтез белка, а также регулирует процессы перекисного окисления липидов в клетках головного мозга, зрительном нерве и нейронах сетчатки, снижает образование свободных радикалов, блокирует процессы свободнорадикального окисления [2, 4–7].

Доставка лекарственного препарата к внутренним тканям глаза при его местном введении сопряжена с определенными трудностями. При использовании препарата в виде глазных капель основным барьером на пути его проникновения во внутренние структуры глаза служит роговица. При этом эпителий роговицы препятствует проникновению липофильных соединений, а строма роговицы плохо проницаема для липофильных соединений и молекул больших размеров (с массой более 500 кДа) [8]. В силу этого наиболее предпочтительным способом введения гидрофильных препаратов, к которым относится кортексин, является парабульбарная, или субтеноновая методика [4].

Исследование диффузии кортексина в склере является важной задачей при оценке дозы лекарственного препарата, необходимой для достижения достаточной концентрации препарата во внутренних тканях глаза. Однако, несмотря на многочисленные исследования проницаемости склеры для различных препаратов [9–12], задача количественной оценки скорости проникновения цитаминов при их трансклеральном введении весьма актуальна.

Коэффициенты проницаемости фиброзной ткани и диффузии в ней лекарственных препаратов можно оценить с помощью методов, основанных на измерении временной зависимости изменения оптических свойств биоткани в результате изменения показателя преломления внутриканальной жидкости [11–15]. Хорошо известно, что

Э.А.Генина, А.Н.Башкатов, В.В.Тучин. Научно-образовательный институт оптики и биофотоники Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: eagenina@yandex.ru

М.Г.Гхосн, К.В.Ларин. Department of Biomedical Engineering, University of Houston, 4800 Calhoun Rd., N207 Engineering Building 1, Houston, Texas, 77204, USA

Т.Г.Каменских. Саратовский государственный медицинский университет, Россия, 410028 Саратов, ул. Вольская, 12; e-mail: kamtanvan@mail.ru

Поступила в редакцию 18 апреля 2011 г.

склера, в основном, состоит из коллагеновых волокон, упакованных в плоские пучки, которые погружены в аморфное базовое вещество [16, 17]. Неоднородности в структуре и различия между показателями преломления гидратированных коллагеновых волокон и внутриклеточной жидкости являются причиной многократного рассеяния света в склере, что делает ее непрозрачной в видимом диапазоне длин волн [13]. Поскольку показатель преломления иммерсионной жидкости (лекарственного препарата) отличается от показателя преломления внутриклеточной жидкости склеры, то частичная замена базового вещества склеры на раствор кортексина будет вызывать оптический отклик биоткани, т.е. изменение ее прозрачности для зондирующего излучения. Анализ временной динамики данного процесса позволяет оценить скорость диффузии лекарственного препарата в тканях глаза.

В настоящей работе представлены результаты экспериментов *in vitro* по измерению скорости диффузии лекарственного препарата «Кортексин» через склеру глаза человека на основе анализа временной динамики сигнала оптической когерентной томографии (ОКТ) и спектров отражения склеры при ее взаимодействии с водным раствором кортексина. Цель работы – исследование проницаемости склеры как основного барьера на пути транспорта высокомолекулярного препарата, которым является кортексин, к внутренним тканям глаза.

2. Материалы и методы

2.1. Подготовка материалов

Материалом для исследования *in vitro* методом отражательной спектроскопии послужили 10 образцов склеры глаза человека. Образцы были получены из энуклеированных глаз человека во время проведения плановой операции – энуклеации слепого глаза с формированием опорной культуры для протеза. ОКТ-измерения проводились на 5 образцах склеры глаз кроликов. Измерения временной зависимости толщины склеры также проводились на 5 образцах склеры глаз кроликов.

Непосредственно после забора образцы склеры помещались в физиологический раствор (0.9 %-ный водный раствор NaCl) и хранились в нем при температуре 4–5 °C до начала измерений. Эксперименты проводились в течение 24 ч после энуклеации ткани. Перед измерениями у образцов склеры удалялся слой ретинального пигментного эпителия. Толщина биоткани измерялась микрометром, для чего образцы помещались между двумя покровными стеклами; измерения выполнялись в нескольких точках образца. Погрешность каждого измерения составляла ± 50 мкм, полученные значения толщин усреднялись.

В качестве исследуемого препарата использовался водный раствор препарата «Кортексин» (концентрация 20 мг/мл) (ООО «Герофарм», Россия). Показатель преломления раствора (1.342) измерялся с помощью рефрактометра Аббе ($\lambda = 589$ нм) непосредственно перед проведением измерений.

Все измерения были выполнены при комнатной температуре (~ 20 °C).

2.2. Метод отражательной спектроскопии

Оценка коэффициента диффузии кортексина в склере глаза выполнялась на основе измерения временной зави-

симости изменения коэффициента отражения исследуемых образцов биоткани.

Для проведения спектрометрических измерений каждый образец склеры закреплялся на специальной кювете с исследуемым раствором таким образом, чтобы раствор соприкасался только с внешней поверхностью образца биоткани. С противоположной стороны к образцу подводился волоконно-оптический датчик, состоящий из семи волокон. Центральное волокно (источник) служило для ввода излучения в биоткань, а шесть других (детекторы), симметрично расположенных по окружности вокруг центрального волокна, – для сбора обратнорассеянного излучения. Диаметр каждого волокна составлял 200 мкм, числовая апертура волокон – 0.2, расстояние между центрами излучающего и приемных волокон – 290 мкм. Источником излучения в спектральной области от 450 до 1000 нм служила галогенная лампа. Излучение, обратно рассеянное образцом склеры, регистрировалось с помощью волоконно-оптического спектрометра с дифракционной решеткой и многоканальным детектором ЛЕСА-5 (ЗАО «Биоспек», Россия). Время накопления сигнала составляло 100 мс, спектрометр калибровался с помощью пластины BaSO₄.

При исследовании взаимодействия водного раствора кортексина с образцами склеры предполагалось, что в результате этого взаимодействия изменяется только показатель преломления внутриклеточной жидкости склеры, что приводит к уменьшению коэффициента рассеяния биоткани вследствие согласования показателей преломления рассеивателей и внутриклеточной жидкости. Исследование временной зависимости данного процесса позволяет оценить коэффициент диффузии как меру средней скорости обменного потока – лекарственного препарата в биоткань и воды из биоткани [12].

Процесс транспорта лекарственных препаратов в биотканях может быть описан в рамках модели свободной диффузии. Использование данной модели можно считать правомочным, т.к. размеры молекулы кортексина (гидродинамический радиус молекул с таким же молекулярным весом составляет 2–3 нм [9]) значительно меньше размеров межфибрилярного пространства в склере. Согласно данным [13], среднее расстояние между фибриллами составляет ~ 285 нм, что позволяет молекулам кортексина свободно диффундировать в межфибрилярном пространстве. В то же время очевидно, что скорость диффузии кортексина во внутриклеточной жидкости склеры будет отличаться от средней скорости диффузии данного агента, рассчитанной для цельной склеры, т.к. в этом случае не учитывается пористость биоткани и, вследствие этого, извилистость диффузионного пути. В настоящей работе выполнена оценка средней скорости транспорта лекарственного препарата (т.е. коэффициент проницаемости) через склеру, которая рассматривается как цельная мембрана, во внутриглазное пространство. Решение данной проблемы имеет значение для оценки дозы лекарственного препарата, доставляемого, например, к сетчатке глаза.

Модель свободной диффузии достаточно широко применяется для исследования транспорта в биотканях молекул с большим молекулярным весом [9, 10, 18, 19]. Так, в [18] проанализировано аксиальное распространение микродозы протеинов, вводимых в мышечные волокна, и показано, что диффузия больших молекул (например, миоглобина) хорошо описывается с помощью

данной модели. В работах [9, 10, 19] для описания диффузии молекул с молекулярным весом от 0.023 до 150 кДа также использовалась модель свободной диффузии.

В настоящей работе используются два допущения относительно процесса диффузии: имеет место только концентрационная диффузия, т. е. поток вещества в биоткани в заданной точке пропорционален градиенту концентрации вещества в ней, и коэффициент диффузии постоянен во всех точках внутри исследуемого образца биоткани.

Геометрически образец склеры представляется плоскопараллельной пластиной конечной толщины. Так как площадь верхней и нижней поверхностей данной пластины намного превышает площадь ее боковых сторон, можно пренебречь краевыми эффектами и решать одномерную задачу диффузии, т. е. уравнение

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

где $C(x, t)$ – концентрация кортексина в склере (г/мл); D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{с}$); t – время, в течение которого происходит диффузия (с); x – пространственная координата по толщине образца биоткани (см). С учетом геометрии и условий измерений соответствующие граничные условия таковы: $C(0, t) = C_0$, $C(l, t) = 0$, где C_0 – концентрация кортексина в растворе; l – толщина образца биоткани (см). Начальные условия свидетельствуют об отсутствии кортексина во всех внутренних точках образца склеры в начальный момент времени, т. е. $C(x, 0) = 0$.

Решение уравнения диффузии с учетом начальных и граничных условий позволяет оценить среднюю концентрацию раствора кортексина внутри образца склеры в каждый момент времени [20–23]:

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

Временная зависимость показателя преломления внутритканевой жидкости может быть получена из закона Гладстона – Дейла, согласно которому показатель преломления раствора $n_s(t)$ складывается из средних показателей преломления его компонентов, отнесенных к их объемным долям [24]:

$$n_s(t) = [1 - C(t)]n_{\text{base}} + C(t)n_{\text{osm}}, \quad (2)$$

где n_{base} – показатель преломления внутритканевой жидкости в начальный момент времени; n_{osm} – показатель преломления раствора кортексина. Поскольку образцы склеры до проведения экспериментов хранились в физиологическом растворе в течение ~ 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. Спектральная зависимость показателя преломления воды имеет следующий вид [25]:

$$n_w(\lambda) = 1.3199 + \frac{6.878 \times 10^3}{\lambda^2} - \frac{1.132 \times 10^9}{\lambda^4} + \frac{1.11 \times 10^{14}}{\lambda^6}, \quad (3)$$

где λ – длина волны (нм).

Оптическая модель биоткани может быть представлена в виде пластины толщиной l , содержащей рассеиватели (коллагеновые фибриллы) – тонкие диэлектрические цилиндры со средним диаметром 100 нм [13], значительно меньшим длины цилиндров. При этом волокна локализованы в плоскостях, параллельных поверхностям образца, но внутри каждой пластины они ориентированы случайным образом [13, 17]. Спектральная зависимость показателя преломления рассеивателей склеры глаза [26]

$$n_c(\lambda) = 1.4389 + 1.588 \times 10^4 \lambda^{-2} - 1.4806 \times 10^9 \lambda^{-4} + 4.3917 \times 10^{13} \lambda^{-6}. \quad (4)$$

В качестве первого приближения предполагалось, что в процессе взаимодействия между биотканью и кортексином размеры рассеивателей не меняются. В этом случае все изменения в рассеянии биоткани связаны с изменением показателя преломления внутритканевой жидкости.

В видимом диапазоне длин волн (за исключением полос поглощения крови) коэффициент поглощения биоткани много меньше коэффициента рассеяния. Поскольку кортексин также не имеет сильных полос поглощения в исследуемом спектральном диапазоне, изменение коэффициента отражения склеры определяется только поведением коэффициента рассеяния.

Моделирование спектров отражения склеры глаза выполнялось методом Монте-Карло (МК) на основе алгоритма, представленного в [27]. В настоящей работе мы модифицировали подпрограмму регистрации фотонов, рассеянных назад, с учетом геометрии используемого в экспериментах волоконно-оптического датчика. МК-моделирование траекторий фотонных пакетов осуществлялось путем последовательного моделирования элементарных событий: генерации длины свободного пробега фотона, актов рассеяния и поглощения, отражения или/и преломления на границах раздела сред. Начальное и конечное состояния фотонов полностью определялись геометрией источника излучения и детектора. Падающий свет представлял собой узкий пучок, направленный по нормали к поверхности ткани. При моделировании спектров отражения детектировались все обратнорассеянные фотоны, попадающие в область приемных волокон волоконно-оптического датчика с учетом их апертуры. Зеркальное отражение фотонов от границы раздела воздух – поверхность ткани при их падении учитывалось отдельно. В случае рассеяния фотонов новое направление выбиралось согласно фазовой функции рассеяния Хеньи – Гринштейна

$$f_{\text{HG}}(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}},$$

где g – фактор анизотропии; θ – полярный угол рассеяния. По азимутальному углу рассеяния распределение полагалось равномерным. Коэффициент рассеяния и фактор анизотропии рассчитывались согласно теории Ми [28]. Подробное описание данного алгоритма представлено в работе [12].

Система уравнений, описывающих зависимость концентрации кортексина от времени, формирует прямую задачу. Обратной задачей в данном случае является восстановление значения коэффициента диффузии по динамике изменения коэффициента отражения склеры. Эта задача была решена путем минимизации целевого функционала

$$F(D) = \sum_{i=1}^{N_t} [R(D, t_i) - R^*(t_i)]^2, \quad (5)$$

где $R(D, t)$ и $R^*(t)$ – рассчитанное и измеренное значения зависящего от времени коэффициента отражения соответственно; N_t – число точек, полученных при регистрации временной зависимости коэффициента отражения. Для минимизации целевой функции (5) использовался «комплексный» метод [29]. Итерационная процедура повторялась до согласования между собой экспериментальных и расчетных данных. Расчет выполнялся для десяти длин волн (500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 и 950 нм), полученные значения коэффициентов диффузии усреднялись.

2.3. Метод оптической когерентной томографии

Измерения проводились с помощью системы ОКТ, в которой использовался низкокогерентный широкополосный источник излучения ближнего ИК диапазона с длиной волны 1310 ± 15 нм и выходной мощностью 3 мВт (ООО «Суперлюминесцентные диоды», Россия). Пучок света, рассеянный образцом, и пучок света, отраженный от зеркала в опорном канале, формировали интерферограмму, которая регистрировалась фотодиодом. Двумерные изображения получали при сканировании падающего пучка по поверхности образца в поперечном направлении и сканировании по глубине (вдоль оси z) с помощью опорного зеркала интерферометра. Эти изображения состояли из 450×450 пикселей (2.2×2.4 мм). Время получения полного изображения составляло примерно 3 с. Двумерные изображения усреднялись в поперечном направлении (~ 1 мм, что достаточно для подавления спекл-шума); при этом формировалась одна кривая для сигнала ОКТ, представляющего собой одномерное распределение интенсивности отраженного света по глубине в логарифмическом масштабе.

Непосредственно перед экспериментом образцы склеры помещались в специальную кювету с физраствором, имеющим комнатную температуру. Во время эксперимента на цельном глазном яблоке его нижняя полусфера находилась в кювете с физраствором для минимизации дегидратации образца. Сигнал ОКТ регистрировался до нанесения агента в течение ~ 7 мин, затем на поверхность исследуемого участка наносился 0.1 мл кортексина. Время непрерывного мониторинга составляло порядка 30 мин.

Коэффициент проницаемости склеры P вычислялся путем деления толщины исследуемого участка (с максимальным изменением ОКТ-сигнала) на время диффузии агента на данном участке: $P = z_{\text{рег}}/t_{\text{рег}}$. Поскольку диффузия кортексина проявляется в изменении наклона сигнала ОКТ (ОКТН) [30], который относительно постоянен как до аппликации агента, так и после достижения насыщения, величина $t_{\text{рег}}$ вычислялось как время насыщения минус время начала изменения сигнала ОКТН (время начала аппликации агента).

3. Результаты и их обсуждение

На рис. 1 и 2 представлены спектры отражения склеры глаза человека, измеренные в различные моменты времени, и временные зависимости изменения коэффициента отражения склеры, измеренные на нескольких длинах волн. Данные спектры характеризуют изменение оптических свойств склеры в процессе ее взаимодействия с раствором кортексина.

Из рис. 1 следует, что в начальный момент времени склера является сильно рассеивающей биотканью с достаточно высоким коэффициентом отражения. Форма спектра отражения определяется, в основном, спектральной зависимостью коэффициента рассеяния склеры. Существенный спад коэффициента отражения при переходе в длинноволновую область спектра связан с выходом обратнорассеянного излучения из области детектирования. Коэффициенты поглощения коллагена, воды и протеинов, входящих в состав биоткани, в исследуемом спектральном диапазоне незначительны, поэтому поглощением света в склере можно пренебречь [31, 32]. Поскольку склера характеризуется низким содержанием крови, поглощение гемоглобина также практически не оказывает влияния на форму спектра при исследованиях *in vitro* [32].

Как было показано ранее [11–14, 30, 32], оптические свойства фиброзных биотканей изменяются под дейст-

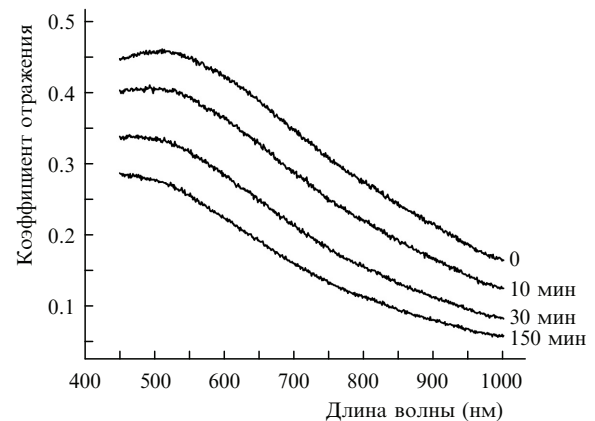


Рис. 1. Типичные спектры отражения склеры глаза человека, измеренные в различные моменты времени в процессе взаимодействия биоткани с раствором кортексина.

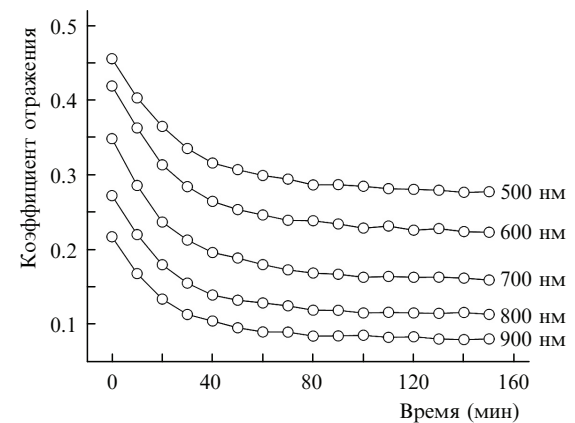


Рис. 2. Временные зависимости изменения коэффициента отражения склеры глаза человека измеренные на различных длинах волн в процессе взаимодействия биоткани с раствором кортексина. Точки – экспериментальные данные, сплошные кривые – аппроксимационные зависимости.

вием иммерсионных агентов, к которым можно отнести и некоторые лекарственные препараты. При этом основным механизмом оптического «просветления» биоткани является согласование показателей преломления рассеивателей (в основном коллагеновых волокон) и внутриканальной жидкости за счет как осмотической дегидратации биоткани, так и диффузии иммерсионных жидкостей в биоткань. Дегидратация ткани, как и модификация структурных волокон, приводит к более плотной и соответственно более регулярной упаковке рассеивателей, что также увеличивает прозрачность биоткани для волн оптического диапазона [32]. Таким образом, рассеяние света в биоткани снижается, а следовательно, уменьшается ее коэффициент отражения (рис. 1 и 2). В среднем для всех образцов коэффициент отражения в исследуемом спектральном диапазоне снизился примерно на $22 \pm 6\%$ в течение первых 10 мин и на $47 \pm 14\%$ за 20 мин с момента начала воздействия кортексина. Важно отметить, что использование такого высокомолекулярного соединения, как кортексин, в качестве иммерсионного агента приводит к значительной осмотической дегидратации ткани.

В процессе проведения эксперимента толщина образцов склеры уменьшилась в среднем примерно на 54% (с 0.63 ± 0.02 до 0.41 ± 0.01 мм), что свидетельствует о высокой осмотической активности кортексина. На рис.3 представлена временная зависимость изменения толщины склеры глаза в результате дегидратации ткани под действием кортексина. Видно, что уменьшение толщины ткани продолжается примерно 2 ч и достаточно хорошо описывается сложной степенной функцией:

$$l(t) = \frac{9542.27 + 0.395t^{1.428}}{15404.5 + t^{1.428}}, \quad (6)$$

где t – время воздействия кортексина (с) и l – толщина склеры (мм). Данные, представленные на рис.3, использовались при проведении МК-моделирования оптического просветления склеры.

Поскольку транспорт растворителя может оказывать довольно существенное влияние на структурные и оптические свойства биоткани, было исследовано влияние диффузии воды на изменение коэффициента отражения склеры. На рис.4 представлена типичная динамика коэффициента отражения склеры глаза человека, измеренная на нескольких длинах волн, при воздействии физиологического раствора на образец. Хорошо видно, что при диффузии в склеру воды, которая является основой фи-

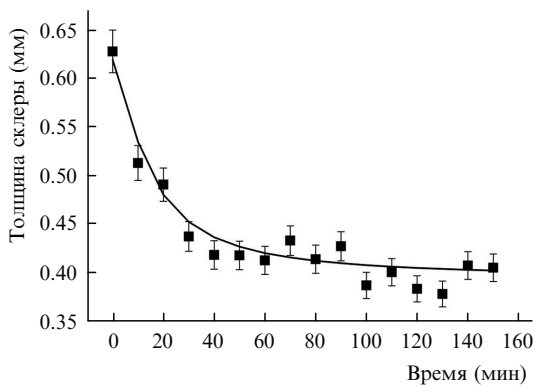


Рис.3. Временная зависимость изменения толщины склеры глаза человека под действием кортексина. Точки – экспериментальные данные, сплошная кривая – аппроксимационная зависимость (6).

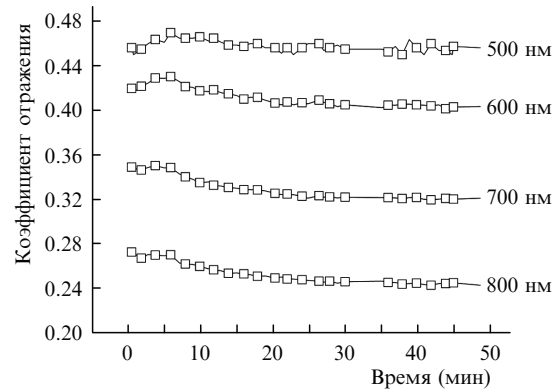


Рис.4. Временные зависимости изменения коэффициента отражения склеры глаза человека на различных длинах волн в процессе взаимодействия биоткани с физиологическим раствором.

зиологического раствора, коэффициент отражения склеры слабо изменяется во всем исследуемом спектральном диапазоне. В среднем изменение коэффициента отражения на выбранных длинах волн за то же время составило не более 5%, из чего следует, что изменения коэффициента отражения склеры, наблюдаемые на рис.1 и 2, вызваны, главным образом, воздействием молекул кортексина, а не воды. Из рис.2 видно, что экспериментальные данные (точки) хорошо согласуются с аппроксимирующими кривыми, полученными в рамках предложенной модели.

Решение обратной задачи путем численного моделирования МК-методом процесса оптического просветления склеры глаза человека в рамках разработанной модели и с использованием измеренной временной зависимости коэффициента отражения позволило оценить коэффициент диффузии кортексина в склере. Расчеты осуществлялись на десяти длинах волн и усреднялись. Полученные данные представлены в табл.1.

На рис.5,а показаны типичные ОКТН-сигналы, полученные от склеры глаза кролика в процессе диффузии кортексина, при глубине зондирования 125 и 50 мкм. Увеличение локальной концентрации кортексина в глубине биоткани способствовало уменьшению ее коэффициента рассеяния и, таким образом, снижению ОКТН-сигнала. Приблизительно через 12 мин после нанесения капля кортексина полностью пропитывала исследуемый участок склеры. Когда препарат достигал внутреннего пространства глаза (водянистой влаги), начинался обратный процесс, связанный с вымыванием кортексина из ткани в области измерений, и сигнал ОКТН возрастал.

В табл.1 приведены значения коэффициентов проницаемости склеры и диффузии кортексина в склере глаза, полученные с помощью различных методов. При использовании метода ОКТН коэффициент проницаемости P рассчитывался из наклона экспериментальной кривой, а коэффициент диффузии оценивался исходя из следующего выражения [33]:

Табл.1. Коэффициенты проницаемости склеры глаза и коэффициенты диффузии кортексина в склере, полученные методами отражательной спектроскопии (ОС) и ОКТ, а также их средние значения.

Метод измерений	Коэффициент проницаемости (см/с)	Коэффициент диффузии (см ² /с)
ОС	$(1.57 \pm 0.95) \times 10^{-5}$	$(0.98 \pm 0.67) \times 10^{-6}$
ОКТ	$(2.40 \pm 0.32) \times 10^{-5}$	$(1.49 \pm 0.25) \times 10^{-6}$
Среднее значение	$(1.99 \pm 0.59) \times 10^{-5}$	$(1.24 \pm 0.36) \times 10^{-6}$

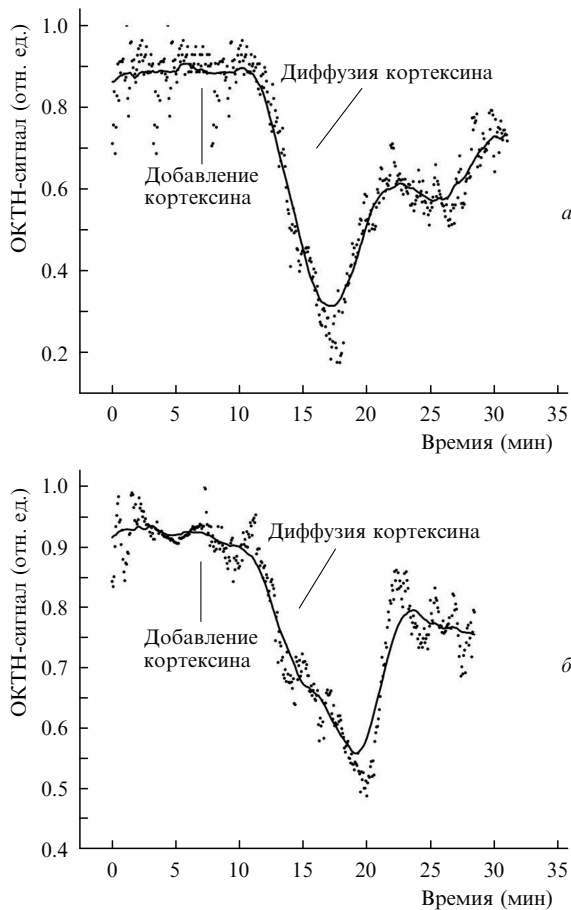


Рис.5. Временная зависимость ОКТН-сигнала в процессе взаимодействия биоткани с раствором кортексина при измерении сигнала на глубине 125 (а) и 50 мкм (б).

$$D = Pl_d, \quad (7)$$

где l_d – глубина зондирования образца биоткани. При глубине зондирования 125 мкм коэффициент диффузии составил $(3 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ см²/с, а при $l_d = 50$ мкм $D = (1.2 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ см²/с. Коэффициент диффузии, усредненный по всем измерениям, был равен $(1.49 \pm 0.25) \times 10^{-6}$ см²/с.

При использовании метода отражательной спектроскопии, напротив, коэффициент диффузии определялся из анализа экспериментально измеренной временной зависимости изменения коэффициента отражения, а коэффициент проницаемости оценивался с использованием уравнения (7) на основе предположения о постоянстве коэффициента диффузии во всем объеме биоткани.

Из табл.1 следует, что коэффициенты проницаемости склеры и коэффициенты диффузии кортексина, полученные методами отражательной спектроскопии и ОКТ, достаточно хорошо согласуются друг с другом.

Эксперименты *in vitro* по диффузии протеинов с высоким (до 150 кДа) молекулярным весом в образцах фиброзной ткани, проведенные с использованием флуоресцентных методов, показали, что склера проницаема для больших молекул [9, 12, 18, 19]. Проницаемость склеры для fluorescein isothiocyanate – декстрана с молекулярным весом 4.4 кДа при 25 °С – по данным [9] составляет $\sim 2.52 \times 10^{-5}$ см/с, отсюда коэффициент диффузии $D = Pl \approx 1.01 \times 10^{-6}$ см²/с (здесь $l \approx 0.5$ мм – средняя толщина образца склеры). Из данных, представленных в ра-

боте [19], можно найти, что коэффициент диффузии декстрана (10 кДа) равен 0.4×10^{-6} см²/с. Коэффициент диффузии цитохрома (12.4 кДа) в мышечных волокнах при температуре 22 °С составляет $\sim 0.16 \times 10^{-6}$ см²/с [18], а коэффициент диффузии ретиналамина (10 кДа) в склере человека равен 1.82×10^{-6} см²/с [12]. Коэффициент проницаемости склеры кролика для воды, полученный с помощью метода ОКТН, составил 6.6×10^{-5} см/с [30], что приблизительно соответствует $D = 0.18 \times 10^{-6}$ см²/с.

Из сравнения полученных нами результатов с литературными данными видно, что значения коэффициентов проницаемости склеры (и соответственно коэффициентов диффузии) для кортексина достаточно близки к данным, полученным для других агентов. Различия между коэффициентами, полученными нами и известными из литературы, можно объяснить различиями в структуре и свойствах исследуемых агентов и биотканей, а также различиями в используемых экспериментальных и вычислительных методах.

4. Заключение

Результаты экспериментов показали, что проникновение кортексина в склеру глаза приводит к снижению коэффициента отражения, а также сигнала ОКТ вследствие оптической иммерсии. Анализ временной зависимости изменения коэффициента отражения образцов склеры позволил оценить коэффициент диффузии кортексина в склере, который составил $(0.98 \pm 0.67) \times 10^{-6}$ см²/с. Найденное с помощью метода ОКТН среднее значение коэффициента диффузии равнялось $(1.49 \pm 0.25) \times 10^{-6}$ см²/с. Результаты, полученные с помощью двух независимых оптических методов, достаточно хорошо согласуются. При этом нужно учитывать, что ОКТ-метод принципиально дает локальную оценку коэффициента диффузии, в нашем случае на отрезке 50 или 125 мкм, в то время как спектрофотометрический метод позволяет найти только его усредненное по всей толщине образца значение, поэтому не следует ожидать полного совпадения результатов, полученных разными методами.

Эти результаты важны для определения ряда параметров, таких как доза введенного лекарственного препарата, достаточная для достижения внутренних отделов глаза, время, необходимое для эффективного воздействия препарата, и т. д., что имеет большое значение для лечения частичной атрофии зрительного нерва и ряда других офтальмологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта АФГИР № RUB1-2932-SR-08 и государственных контрактов № 02.740.11.0770 и 02.740.11.0879.

1. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. *Цитомедины (25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований)* (СПб.: Наука, 1998).
2. Хавинсон В.Х., Трофимова С.В. *Пептидные биорегуляторы в офтальмологии* (СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000).
3. Максимов И.Б., Нероев В.В., Алексеев В.Н., Разумовский М.И., Трофимова С.В. *Применение препарата ретиналамин в офтальмологии* (СПб.: ИКФ «Фолиант», 2003).
4. Каменских Т.Г., Башкатов А.Н., Тучин В.В., Генина Э.А. *Клиническая офтальмология*, 7 (4), 147 (2006).
5. Каменских Т.Г., Башкатов А.Н., Тучин В.В., Генина Э.А. *Саратовский научно-медицинский журнал*, 1 (15), 77 (2007).
6. *Cortexin. Five years in neurological practice in Russia*. A.A.Skogramets, M.M.Dyakov (Eds) (St.Petersburg: Nauka, 2007).
7. www.vidal.ru/poisk_preparatov/doc_9209.htm#top.

8. Астахов Ю.С., Егоров Е.А., Ставицкая Т.В. *Клиническая офтальмология*, **5** (1), 2 (2004).
9. Ambati J., Canakis C.S., Miller J.W., Gragoudas E.S., Edwards A., Weissgold D.J., Kim I., Delori F.C., Adamis A.P. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, **41**, 1181 (2000).
10. Boubriak O.A., Urban J.P.G., Akhtar S., Meek K.M., Bron A.J. *Exp. Eye Res.*, **71**, 503 (2000).
11. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Кочубей В.И., Лакодина Н.А., Тучин В.В. *Биофизика*, **48** (2), 309 (2003).
12. Genina E.A., Bashkatov A.N., Zubkova E.A., Kamenskikh T.G., Tuchin V.V. *Opt. Las. Engineering*, **46**, 915 (2008).
13. Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. *J. Biomed. Opt.*, **2**, 401 (1997).
14. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **36** (12), 1119 (2006).
15. Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Tuchin V.V. *Biophysical J.*, **85** (5), 3310 (2003).
16. Rol P.O. *Optics for Transscleral Laser Applications* (D.N. Sci. diss.) (Zurich: Institute of Biomedical Engineering, 1992).
17. Komai Y., Ushiki T. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, **32**, 2244 (1991).
18. Papadopoulos S., Jurgens K.D., Gros G. *Biophysical J.*, **79**, 2084 (2000).
19. Olsen T.W., Edelhofer H.F., Lim J.I., Geroski D.H. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.*, **36**, 1893 (1995).
20. Pirot F., Kalia Y.N., Stinchcomb A.L., Keating G., Bunge A., Guy R.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1562 (1997).
21. Stinchcomb A.L., Pirot F., Touraille G.D., Bunge A.L., Guy R.H. *Pharm. Res.*, **16**, 1288 (1999).
22. Tsai J.-C., Lin C.-Y., Sheu H.-M., Lo Y.-L., Huang Y.-H. *Pharm. Res.*, **20**, 632 (2003).
23. Watkinson A.C., Brain K.R. *J. Toxicology (Cutaneous and Ocular Toxicology)*, **21**, 371 (2002).
24. Leonard D.W., Meek K.M. *Biophysical J.*, **72**, 1382 (1997).
25. Kohl M., Esseupreis M., Cope M. *Phys. Med. Biol.*, **40**, 1267 (1995).
26. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Tuchin V.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4162**, 265 (2000).
27. Wang L., Jacques S.L., Zheng L. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **47**, 131 (1995).
28. Bohren C.F., Huffman D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (New York: Wiley, 1983).
29. Банди Б. *Методы оптимизации* (М.: Радио и связь, 1988).
30. Ларин К.В., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **38** (6), 551 (2008).
31. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В. *Оптика и спектроскопия*, **109** (2), 226 (2010).
32. Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2007, PM 166).
33. Котык А., Яначек К. *Мембранный транспорт* (М.: Мир, 1980).1