

Определение коэффициента диффузии 40%-глюкозы в ткани десны человека оптическим методом

© А.А. Селифонов^{1,2}, В.В. Тучин^{1,3,4,5}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

² Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, 410012 Саратов, Россия

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

⁴ Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО, 197101 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028 Саратов, Россия

e-mail: selif-ei@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.12.2019 г.

В окончательной редакции 30.01.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Благодаря значительному развитию оптических технологий и методов, используемых как для неинвазивной диагностики биотканей, так и для уточнения протоколов фотодинамической терапии, фототермической деструкции, оптической биопсии, томографии и др., актуальной является проблема увеличения глубины проникновения света в биоткани, которая решается с помощью применения иммерсионных агентов, в том числе и гиперосмотических, таких как глюкоза. При этом важное значение имеет определение количественных характеристик диффузии иммерсионных агентов в биологических тканях. В настоящей работе проведено определение эффективного коэффициента диффузии 40%-раствора глюкозы в ткани слизистой десны человека *in vitro*, который составил $(4.1 \pm 0.8) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Метод основан на регистрации кинетики изменения спектров диффузного отражения и применения модели свободной диффузии.

Ключевые слова: диффузное отражение, закон Фика, просветляющий агент, свободная диффузия.

DOI: 10.21883/OS.2020.06.49408.29-20

Введение

Одним из актуальных и перспективных направлений современной медицины является тераностика, объединяющая диагностику и персонализированное лечение пациента с улучшенной эффективностью и безопасностью, именно в оптическом ее варианте [1]. Совершенствование оптического инструментария и агентов-маркеров патологий для получения изображений биологических объектов позволило осуществлять характеристику патологических процессов на клеточном и молекулярном уровнях на достаточно ранних этапах формирования [2,3]. Решение ряда биофизических задач, связанных с повышением эффективности светового взаимодействия с клетками и тканями при проведении ранней диагностики, а также при терапевтическом воздействии на патологический очаг с обеспечением безопасности для здоровых окружающих тканей, относится к одной из важнейших медицинских стратегий.

В медицинской практике используется весь диапазон длин волн оптического излучения от короткого ультрафиолетового (УФ) до терагерцового [2], но чаще всего УФ излучение — коротковолновое (100–280 nm, УФС), средневолновое (280–315 nm, УФВ) и длинноволновое

(315–400 nm, УФА), видимое (400–780 nm) и инфракрасное (780 nm–30 μm), которое оказывает фотохимическое или фотофизическое воздействие, включая тепловое [4]. Последние годы в биомедицине все активнее используется терагерцовое излучение, которое занимает диапазон длин волн от 30 μm до 3 mm [5].

Оптическое излучение является достаточно привлекательным с точки зрения морфофункциональной диагностики биотканей вследствие неинвазивности, отсутствия ионизирующих влияний (видимый и ближний ИК диапазоны), потенциальной возможности многопараметрической диагностики, достижения пространственного разрешения на клеточном и даже субклеточном уровнях. Несмотря на значительные успехи, достигнутые к настоящему времени в оптических биомедицинских исследованиях при зондировании биологических объектов оптическим излучением, возникают определенные проблемы. При взаимодействии света с биологическими тканями свободному его распространению мешают такие явления, как отражение, рассеяние и поглощение. Среди биологических тканей почти прозрачными для видимого света можно считать роговицу и хрусталик глаза. Многие другие ткани (в частности, ткань слизистой десны человека), в которых падающее излучение

сильно рассеивается, являются непрозрачными (мутными) средами [2,6]. Из-за этого глубокое зондирование мутных сред сильно затруднено. Поэтому направленное и обратимое изменение оптических параметров верхних слоев биотканей (уменьшение рассеивающих свойств) может значительно расширить возможности оптической медицинской диагностики и терапии, в частности в стоматологии. В настоящее время для этих целей используют иммерсионные жидкости, которые путем взаимодействия с биотканями, содержащими значительное количество воды, проникают в биоткань и заменяют воду, выравнивая показатель преломления компонентов ткани, тем самым уменьшая ее оптическую неоднородность, т.е. рассеяние (мутность), что способствует эффективному проникновению света в биоткань [2,7–12]. Для уменьшения рассеяния света в биотканях применяются как гиперосмотические агенты, такие как глюкоза, сорбитол, глицерин, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, диметилсульфоксид, так и растворы, имеющие нормальную осмолярность, такие как рентген-контрастное вещество йогексол, и др. [13–15].

В качестве оптически просветляющих агентов (ОПА) часто используются растворы глюкозы различных концентраций. Глюкоза или декстроза, $C_6H_{12}O_6$ — органическое соединение из класса альдогексоз, является полигидроксиальдегидом. Это сладкое на вкус, бесцветное кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде, один из самых распространенных источников энергии в живых организмах. Содержится во многих растениях и образуется в процессе фотосинтеза. Из изомеров глюкозы в природе наиболее распространена D-глюкоза, которая усваивается живыми организмами, содержится в виде гранул в цитоплазме клеток практически всех органов и тканей, однако наибольшее его количество накапливается в мышцах и печени.

Несмотря на многочисленные исследования, связанные с управлением оптическими свойствами биотканей, проблема определения коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биотканях остается недостаточно изученной до настоящего времени. Вследствие сложного многокомпонентного строения биотканей и нелинейного характера процессов диффузии определение количественных характеристик диффузии иммерсионных жидкостей в биотканях является сложной научной задачей.

Целью настоящей работы было определение эффективного коэффициента диффузии 40%-глюкозы в ткани слизистой десны человека *in vitro*, используя кинетический метод спектроскопии диффузного отражения в области длин волн 200–800 nm и модель свободной диффузии.

Материалы и методы

Материалом для *in vitro* исследования послужили срезы слизистой десны человека, полученные из морга от женщины, умершей в возрасте 54 лет при дорожно-

транспортном происшествии, не имевшей патологии со стороны слизистой ротовой полости. Из клиники после операционного вмешательства. Полученные биоптаты помещались между предметными стеклами и хранились в замороженном состоянии до проведения эксперимента. Эксперименты *in vitro* выполнялись на 10 образцах срезов слизистой десны человека."

Материалом для *in vitro* исследования послужили срезы слизистой десны человека, из клиники после операционного вмешательства. Полученные биоптаты помещались между предметными стеклами и хранились в замороженном состоянии до проведения эксперимента. Эксперименты *in vitro* выполнялись на 10 образцах срезов слизистой десны человека. Толщина образцов биоткани измерялась микрометром, ткань слизистой десны помещали между двумя предметными стеклами (толщину которых затем вычитали), измерения проводились в нескольких точках образца и усреднялись. Точность каждого измерения $\pm 10 \mu m$. В среднем толщина образцов срезов слизистой десны составила 0.48 ± 0.06 см.

В качестве иммерсионного агента использовался фармпрепарат, раствор для внутривенного введения — 40%-глюкоза (ООО „Гротекс“, Россия), pH раствора равен 3.5. Измерения pH раствора проводили с помощью pH-метра EL2-Kit (Mettler Toledo, Швейцария).

Для измерения коэффициентов отражения образцов ткани в спектральном диапазоне 200–800 nm использовался двухлучевой спектрофотометр Shimadzu UV-2550 (Япония) с интегрирующей сферой. Источником излучения служила галогеновая лампа с фильтрацией излучения в исследуемом спектральном диапазоне. Нормировка спектров перед началом измерений проводилась на сигнал от эталонного отражателя $BaSO_4$. На рис. 1 указано расположение образца при регистрации спектров диффузного отражения. Все эксперименты проводились при комнатной температуре ($\sim 25^\circ C$) и нормальном атмосферном давлении.

Определение коэффициента диффузии 40%-глюкозы в биоткани основано на измерении кинетики оптических спектров диффузного отражения (СДО). Для проведения этих измерений каждый образец среза биоткани фиксировался в специальном зажиме в виде рамки с окном 0.5×0.5 см, прижатой к стенке кварцевой кюветы на входе луча в спектрофотометр таким образом, чтобы между поверхностью образца и стенкой кюветы не было свободного пространства, заполняемого глюкозой. Перед измерениями кювету заполняли физиологическим раствором для смачивания исследуемого образца (т.е. имитации физиологического состояния биоткани). По истечении 5 min физиологический раствор удаляли с помощью шприца, после чего кювету заполняли диффундирующим агентом и проводили измерения. Измерения интенсивности диффузного отражения образцов десны человека проводили в течение 100 min, вплоть до насыщения этой зависимости от времени за счет завершения процесса диффузии агента.

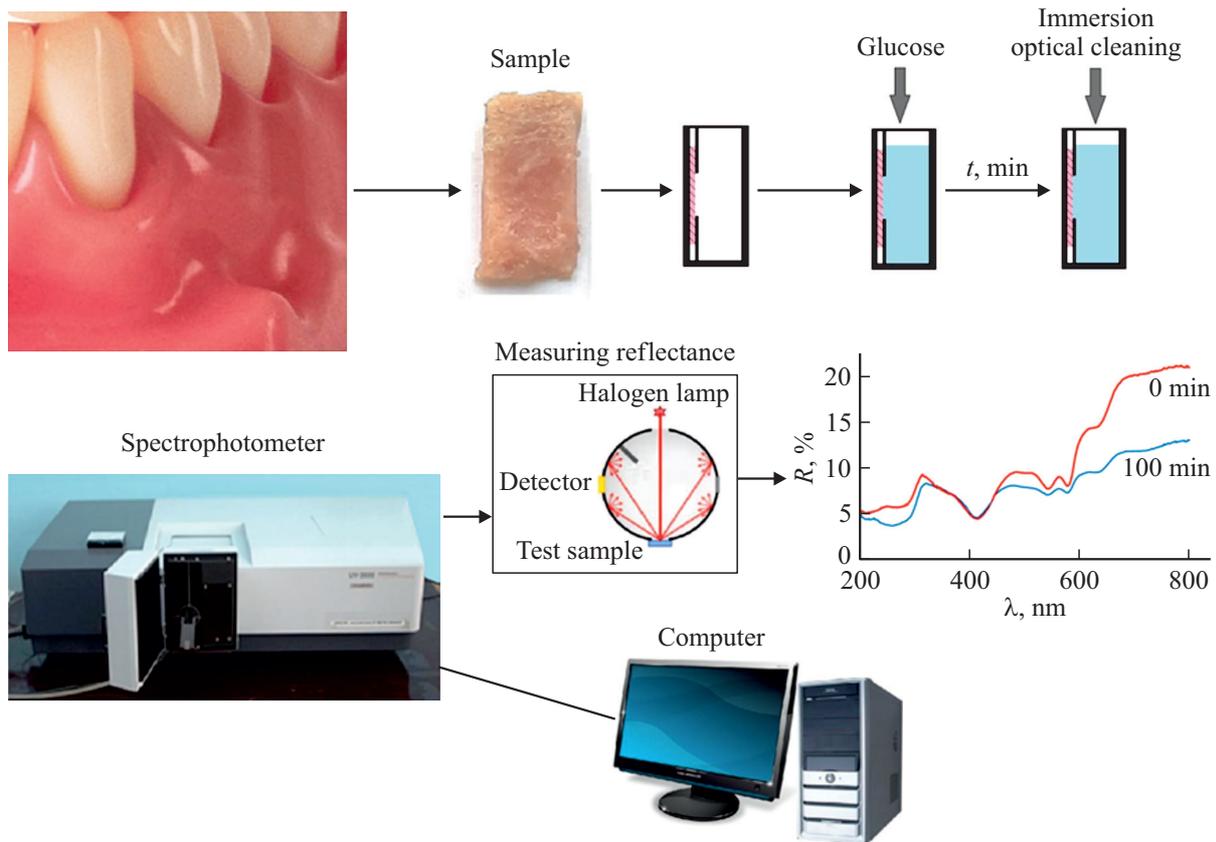


Рис. 1. Блок-схема для измерений *in vitro* коэффициентов диффузного отражения образцов десны человека в процессе диффузии 40%-глюкозы с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-2550.

Процесс транспорта вещества в образце биологической ткани можно описать в рамках модели свободной диффузии [16]. Геометрически образец биологической ткани можно представить в виде плоскопараллельной пластины конечной толщины. Необходимо также учитывать некоторые ограничения, присущие модели свободной диффузии: 1 — имеет место только концентрационная диффузия, 2 — коэффициент диффузии постоянен во всех точках внутри исследуемого образца ткани, 3 — объем агента значительно превышает объем биологического образца, 4 — до начала эксперимента предполагается отсутствие агента во всех внутренних точках образца.

Используя второй закон Фика и проводя преобразования, основанные на использовании модифицированного закона Бугера-Ламберта-Бера, подробно описанные в [17,18], получаем выражение для разности между эффективной оптической плотностью в текущий момент времени $A(t, \lambda)$ и в начальный момент времени $A(t = 0, \lambda)$:

$$\Delta A(t, \lambda) = A(t, \lambda) - A(t = 0, \lambda) = \Delta \mu_{\text{eff}}(t, \lambda) L \sim C_0 \{1 - \exp(-\pi^2 D / 4t^2)\} L, \quad (1)$$

$$\mu_{\text{eff}}(t, \lambda) = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_a)} \rightarrow \Delta \mu_{\text{eff}}(t, \lambda),$$

где эффективная оптическая плотность определяется из измерений СДО:

$$A = -\log R, \quad (2)$$

t — время, в течение которого происходит процесс диффузии ОПА, s ; λ — длина волны, nm ; $\Delta \mu_{\text{eff}}(t, \lambda)$ — разность между эффективным коэффициентом ослабления света в биоткани в текущий момент времени и в начальный момент времени, $1/cm$; $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$, $1/cm$, g — фактор анизотропии рассеяния (изменяется в пределах от 0 до 1, для дентина $g \cong 0.93$ [19]); L — эффективная глубина зондирования, определяемая геометрией оптического детектора (в настоящей работе параметрами интегрирующей сферы), cm ; D — коэффициент диффузии молекул ОПА, cm^2/s ; C_0 — начальная концентрация ОПА, mol/l .

Зарегистрированные в процессе эксперимента СДО ($R(\lambda, \%)$) преобразовывали с использованием стандартного алгоритма Кубелки-Мунка, реализованного в программном обеспечении спектрофотометра Shimadzu UV-2550, с учетом уравнения (2) в спектры ослабления в единицах оптической плотности ($A(\lambda)$). Анализ кинетики для разности эффективной оптической плотности ΔA с использованием уравнения (1) и учетом коэффициентов для аппроксимации экспериментальных

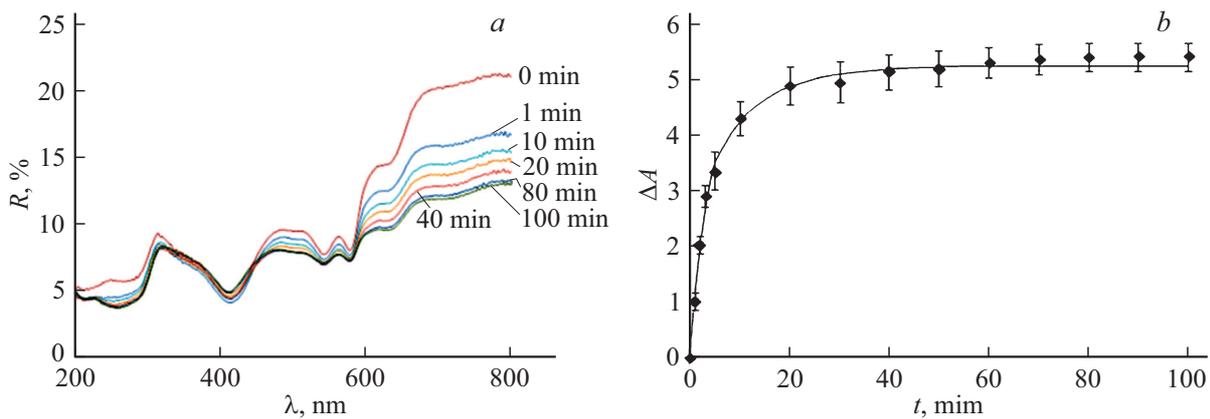


Рис. 2. (а) Спектры диффузного отражения ткани десны человека в процессе иммерсии в 40%-растворе глюкозы в течение 100 min; (б) кинетика разностной эффективной оптической плотности ткани десны человека в процессе диффузии 40%-раствора глюкозы. Символы соответствуют экспериментальным данным, сплошная кривая представляет аппроксимацию экспериментальных данных в рамках предложенной модели свободной диффузии.

данных позволял рассчитать коэффициент диффузии 40%-глюкозы в срезе десны человека (D).

Результаты и обсуждение

Десна человека состоит из слизистой оболочки, которая покрывает верхнюю и нижнюю челюсть вокруг зубов. Защитная функция слизистой десны определяется наличием в ее составе таких веществ и клеточных элементов, как гиалуроновая кислота, макро- и микрофаги, плазма. Благодаря своей коллагеновой структуре, образующейся из фибробластов, ткани обладают достаточно высокой плотностью. С оптической точки зрения ткань слизистой десны можно отнести к фиброзным тканям, которые в основном состоят из многократно переплетенных друг с другом коллагеновых волокон, упакованных в лентообразные пучки [20], и окруженных аморфным базовым веществом (внутриклеточной жидкостью), содержащим протеогликаны, гликопротеины, белки, полисахаридные комплексы и т.д. и образующим внутриклеточный матрикс [21].

Глюкоза является эффективным средством для оптического просветления биотканей, при взаимодействии которого происходит диффузия в образец десны иммерсионной жидкости и осмотический отток воды из биоткани, вследствие чего происходит согласование показателей преломления рассеивателей и внутриклеточной жидкости, что приводит к уменьшению коэффициента рассеяния биоткани. Являясь гигроскопическим агентом, глюкоза способна вытягивать внутриклеточную и межклеточную воду из биоткани за счет осмоса, увеличивая показатель преломления биоткани [22].

СДО образца десны человека представлены на рис. 2, а. В УФ области они имеют ярко выраженные спады, характерные для полос поглощения белков соединительной ткани в виде коллагеновых и ретикулярных волокон, а также гемоглобина. В области около

415–420 nm и 540–580 nm наблюдаются провалы на СДО, что соответствует полосам поглощения оксигемоглобина (415, 542 и 576 nm). Поглощение воды в измеряемом диапазоне 200–800 nm пренебрежимо мало [23].

После иммерсии образцов ткани десны в 40%-растворе глюкозы полосы поглощения эндогенных хромофоров десны (оксигемоглобина) на СДО становятся менее выраженными, что связано с более низкой вероятностью эффективного поглощения фотонов при их прохождении через просветленный (менее рассеивающий) образец биоткани. При этом форма спектров практически не меняется. Значения коэффициентов диффузного отражения снижаются (рис. 2, а) по отношению к исходному образцу, что говорит об уменьшении рассеяния образца слизистой десны. Наибольшие изменения СДО наблюдаются в диапазоне длин волн от 625 до 800 nm, поскольку излучение в этом интервале проникает в биологические ткани на большую глубину (это так называемое первое „терапевтическое/диагностическое окно прозрачности“, между 625 и 975 nm), поскольку ни эндогенные хромофоры (макромолекулы), ни вода не поглощают сильно в этом диапазоне [2,24].

На рис. 2, б показана типичная усредненная кинетическая кривая для изменения оптической плотности ΔA образца десны человека, при его иммерсии в 40%-глюкозе, в интервале длин волн от 200–800 nm. Хорошо видно, что значительные изменения оптической плотности образца десны наблюдаются в течение примерно 20 min с момента начала его взаимодействия с просветляющим агентом, после чего зависимость насыщается и перестает меняться со временем, что говорит о завершении процесса диффузии молекул глюкозы в ткань. Коэффициент диффузии 40%-глюкозы определяли методом наименьших квадратов из анализа участка экспериментальной кривой, соответствующего значительному изменению оптической плотности. Вычисления для каждого образца выполнялись для десяти длин волн в

спектральной области 200–800 nm, а полученные значения усреднялись. В среднем значение коэффициента диффузии 40%-глюкозы в ткани десны человека *in vitro* составило $(4.1 \pm 0.8) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Полученные значения коэффициента диффузии находятся в диапазоне $(0.8-6.1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [12,16,22,25–29], что характерно для диффузии такого рода молекул в биологических тканях. Так, авторы [12] определили значение коэффициента диффузии 40%-раствора глюкозы в коже мышей *ex vivo* и *in vivo*, который составил $(1.1-0.8) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ и $(1.5-0.3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ соответственно. В работе [22] коэффициент диффузии 40%-раствора глюкозы в коже человека *in vivo* был оценен как $(2.6-0.1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. В водном перенасыщенном растворе коэффициент диффузии глюкозы составляет $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [25], а при малой концентрации глюкозы в воде $5.2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [26]. При исследовании диффузии в мягких фиброзных тканях авторы [28] получили значение коэффициента диффузии 40%-раствора глюкозы в твердой мозговой оболочке человека, равным $(6.08-0.03) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Коэффициент диффузии глюкозы в мышечной ткани *in vitro* при исследовании водного 40%-раствора глюкозы получен равным $0.84 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [29]. Полученные результаты хорошо соотносятся с литературными данными, учитывая структурную организацию слизистой десны.

Выводы

Определен коэффициент диффузии 40%-глюкозы в сильно рассеивающей среде, а именно в слизистой десны человека *in vitro*, который составил в среднем $(4.1-0.8) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Измерения осуществлены с помощью спектроскопии диффузного отражения и применения модели свободной диффузии. Процесс диффузии завершается полностью в течение 50–80 min ($n = 10$). При насыщении образца 40%-глюкозой происходит уменьшение интенсивности диффузного отражения образцов десны из-за уменьшения рассеяния, что способствует увеличению глубины проникновения оптического излучения в биоткань, что позволяет сделать вывод о достаточной эффективности применения 40%-раствора глюкозы в качестве оптического просветляющего агента для управления оптическими характеристиками десны человека. Представленные результаты могут быть использованы в стоматологии для усовершенствования имеющихся, а также разработки новых методик оптической диагностики, для лазерной терапии, а также при проведении процедур фотодинамической и фототермической терапии.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований 17-00-00275 (К) (17-00-00272).

Соблюдение этических стандартов

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Поляновский О.Л., Лебедеко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 3. С. 289; Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // Bio Chemistry. 2012. V. 77. N 3. P. 227.
- [2] Tuchin V.V. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics. 3rd edn. Bellingham, WA: SPIE Press, 2015. 866 p.
- [3] Weissleder R., Pittet M.J. // Nature. 2008. V. 452. P. 580.
- [4] Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях, 2-е издание. М.: Физматлит, 2010. 488 с.
- [5] Smolyanskaya O.A., Chernomyrdin N.V., Konovko A.A., Zaytsev K.I., Ozheredov I.A., Cherkasova O.P., Nazarov M.M., Guillet J.-P., Kozlov S.A., Kistenev Yu.V., Coutaz J.-L., Mounaix P., Vaks V.L., Son J.-H., Cheon H., Wallace V.P., Feldman Yu., Popov I., Yaroslavsky A.N., Shkurinov A.P., Tuchin V.V. // Progress in Quantum Electronics. 2018. V. 62. P. 77.
- [6] Nickell S., Hermann M., Essenpreis M., Farrell T.J., Krämer U., Patterson M.S. // Phys. Med. Biol. 2000. V. 45. N 10. P. 2873.
- [7] Jing D., Zhang S., Luo W., Gao X., Men Y., Ma C., Liu X., Yi Y., Bugde A., Zhou B.O. // Cell Res. 2018. V. 28. N 8. P. 803.
- [8] Kubota S.I., Takahashi K., Nishida J., Morishita Y., Ehata S., Tainaka K., Miyazono K., Ueda H.R. // Cell Rep. 2017. V. 20. N 1. P. 236.
- [9] Carneiro I., Carvalho S., Henrique R., Oliveira L.M., Tuchin V.V. // J. Biophotonics. 2019. V. 12. P. e201800333.
- [10] Oliveira L., Carvalho M.I., Nogueira E., Tuchin V.V. // J. Innov. Opt. Health Sci. 2016. V. 9. P. 1650035.
- [11] Oliveira L.M., Carvalho M.I., Nogueira E., Tuchin V.V. // Laser Phys. 2013. V. 23. N 7. P. 075606.
- [12] Tuchina D.K., Timoshina P.A., Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A. // IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics. 2019. V. 25. N 1. P. 7200508.
- [13] Genina E.A., Bashkatov A.N., Korobko A.A., Zubkova E.A., Tuchin V.V., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B. // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13. N 2. P. 021102.
- [14] Mao Z., Zhu D., Hu Y., Wen X., Han Z. // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13. N 2. P. 021104.
- [15] Becker K., Jahrling N., Saghafi S., Weiler R., Dodt H.-U. // PLoS One. 2012. V. 7. P. e33916.
- [16] Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М.: Мир, 1980. 344 с.
- [17] Oliveira L.M.C., Tuchin V.V. The Optical Clearing Method. A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering. Springer Briefs in Physics, 2019. 177 p.
- [18] Генина Э.А., Башкатов А.Н., Чикина Е.А., Тучин В.В. // Биофизика. 2007. Т. 52. № 6. С. 1104.

- [19] Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике, 2-е изд. М.: Физматлит, 2012. 811 с.
- [20] Komai Y., Ushiki T. // *Ophthalmol. & Vis. Sci.* 1991. V. 32. N 8. P. 2244.
- [21] Culav E.M., Clark C.H., Merrilees M.J. // *Phys. Therapy.* 1999. V. 79. P. 308.
- [22] Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. // *Biological Fluids and Tissues*. Ed. by V.V. Tuchin. Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009. 587 p.
- [23] Berg J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J. Jr., Stryer L. *Biochemistry*. 6th edn. WH Freeman, NY., 2006. 194 p.
- [24] Golovynskyi S., Golovynska I., Stepanova L.I., Datsenko O.I., Liu L., Qu J., Ohulchanskyi T.Y. // *J. Biophotonics*. 2018. V. 11. N 12. P. e201800141.
- [25] Gutter F.J., Kegeles G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. V. 75. N 15. P. 3900.
- [26] Григорьев И.С., Мейлихов Е.З. Физические величины. Справочник. М.: Энергоатомиздат, 1991. 1236 с.
- [27] Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood*. V. PM 154. Bellingham, WA: SPIE Press, 2006. 265 p.
- [28] Башкатов А.Н., Генина Э.А., Тучин В.В. // *Известия Саратовского университета, Новая серия. Серия Физика*. 2018. Т. 18. № 1. С. 32.
- [29] Oliveira L.M., Carvalho M.I., Nogueira E., Tuchin V.V. // *Laser Physics*. 2013. V. 23. N 7. P. 075606.