



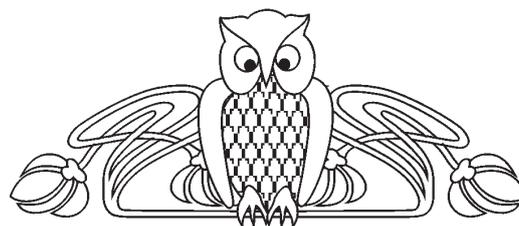
24. Kraskov A. Synchronization and Interdependence Measures and their Applications to the Electroencephalogram of Epilepsy Patients and Clustering of Data: Dissertation (PhD thesis). Research Centre Jülich, John von Neumann Institute for Computing, 2004. 90 p.
25. Kraskov A., Kreuz T., Andrzejak R. G., Stoegbauer H., Nadler W., Grassberger P. Extracting phases from aperiodic signals. 2004. arXiv:cond-mat/0409382. URL: <http://arxiv.org/abs/cond-mat/0409382>.
26. Короновский А. А., Макаров В. А., Павлов А. Н., Ситникова Е. Ю., Храмов А. Е. Вейвлеты в нейродинамике и нейрофизиологии. М. : Физматлит, 2013. 272 с.
27. Torrence C., Compo G. P. A practical guide to wavelet analysis // Bull. Amer. Meteorol. Soc. 1998. Vol. 79. P. 61.
28. Короновский А. А., Храмов А. Е. Непрерывный вейвлетный анализ и его приложения. М. : Физматлит, 2003. 170 с.

УДК 535.015, 617.7, 617.715, 57.085.2

## ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ ПРИ УКРЕПЛЕНИИ СКЛЕРЫ МЕТОДОМ ФОТОСШИВАНИЯ КОЛЛАГЕНА

М. Е. Швачкина, А. Б. Правдин

Саратовский государственный университет  
E-mail: marevesh@mail.ru



В работе приведен первый оценочный результат по влиянию оптического просветления на эффективность методики укрепления склеры глаза путем формирования рибофлавин/УФ фотосшивок коллагена. В предварительной серии экспериментов была рассмотрена эффективность оптического просветления склеры различными просветляющими агентами в ультрафиолетовой области (на длине волны 370 нм) и также было показано, что оптическое просветление образца склеры чистым глицерином с последующей регидратацией не приводит к изменениям его механических свойств. В эксперименте по рибофлавин/УФ фотосшиванию коллагена показано, что оптическое просветление образца склеры свиньи глицерином в идентичных (по отношению к контролю) условиях обработки рибофлавином и последующего УФ облучения приводит к большему увеличению эффективной жесткости склеры при малых деформациях.

**Ключевые слова:** фотосшивка коллагена, миопия, механические свойства склеры, оптическое просветление.

### On the Use of Optical Clearing in Strengthening the Sclera by Collagen Photocrosslinking

М. Е. Shvachkina, A. B. Pravdin

In the paper, the first evaluation results on the effect of optical clearing on the efficiency of the technique of eye sclera strengthening through the formation of riboflavin / ultraviolet collagen photocrosslinks are presented. In a series of preliminary experiments the effectiveness of different optical clearing agents in clearing sclera in ultraviolet region (370 nm) was studied, and it was also shown that the optical clearing of sclera sample with pure glycerol with subsequent rehydration did not change its mechanical properties. In the experiment on riboflavin / UV collagen photocrosslinking it was shown that the optical clearing of the porcine sclera sample with glycerol, the conditions of treatment with riboflavin and subsequent UV irradiation being identical to the control, leads to a

greater increase in the effective stiffness of sclera at small strains.  
**Key words:** collagen photocrosslinking, myopia, sclera mechanical properties, optical clearing.

DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-4-37-41

В настоящее время одним из распространенных глазных заболеваний является близорукость [1, 2]. Серьезной формой данного заболевания является прогрессирующая миопия, характеризующаяся быстрым падением остроты зрения за короткий промежуток времени. Одной из главных причин развития близорукости является растяжение и истончение склеры.

Склера представляет собой плотную соединительную ткань, которая в основном состоит из коллагеновых волокон, упакованных в пучки в виде ламелей и формирующую характерную слоистую структуру. Примерно 90% от толщины склеры составляет строма, которая в значительной степени определяет ее биомеханические свойства. Строма склеры состоит из косо расположенных и переплетающихся пучков коллагеновых волокон различной толщины и длины, эластических волокон, незначительного количества основного вещества, представленного нейтральными и кислыми мукополисахаридами, а также клеток (склероциты) [3]. Коллагеновые волокна упакованы в пучки и лежат в них параллельно друг другу, однако не так регулярно, как в роговице. Пучки волокон имеют широкий разброс по ширине (1–50 мкм) и толщине (0,5–



6 мкм) и имеют тенденцию быть толще и шире во внутренних слоях стромы [4].

Существуют различные методы лечения миопии различной степени, среди которых выделяют медикаментозное лечение и хирургическое вмешательство. В последнее время был предложен инновационный метод лечения прогрессирующей миопии, направленный на предотвращении деформации ткани, основанный на формировании поперечных межмолекулярных связей молекул коллагена волокон стромы склеры под действием раствора рибофлавина и ультрафиолетового излучения. Был проведен ряд работ [5–8], направленных на исследования влияния такого воздействия на склеру кролика, свиньи, человека и на возможность применения метода *in vivo*. Но УФ-индуцированное образование ковалентных связей в толще стромы склеры осложнено малой глубиной проникновения ультрафиолетового излучения из-за сильного рассеяния биотканью. Вероятно, это является как минимум одной из причин того, что данный метод приводит к незначительному увеличению прочности склеры человека и свиньи [7].

Увеличение глубины проникновения оптического излучения в биоткань может быть достигнуто при использовании оптического просветления – методики, направленной на снижение рассеивающих свойств ткани путем согласования показателей преломления дискретных рассеивателей (в случае склеры это коллагеновые волокна и их пучки) и основного вещества ткани. Можно ожидать, что если перед УФ облучением склеру, обработанную раствором рибофлавина, подвергнуть действию осмотически активных просветляющих агентов, то это будет способствовать образованию УФ-индуцированных сшивок на всей глубине диффузии рибофлавина и увеличению тем самым эффективности механического укрепления склеры.

Расчетные оценки и экспериментальные результаты показывают, что применение оптических просветляющих агентов к склере улучшает согласование показателей преломления коллагеновых волокон и межфибриллярной жидкости, что приводит к значительному уменьшению рассеяния света склерой в видимом и инфракрасном диапазоне [9–14]. Из результатов исследований следует, что при воздействии глюкозы и пропиленгликоля характерное время отклика для оптического просветления склеры составляет 10–20 мин [11].

При анализе имеющейся литературы было установлено, что исследования оптического

просветления склеры в ультрафиолетовой спектральной области практически не проводились. Поэтому нами были проведены предварительные эксперименты по сравнению эффективности различных просветляющих агентов в просветлении склеры кролика *ex vivo* на длине волны 370 нм. Именно эта длина волны в литературе предлагается для использования в методике рибофлавин/УФ сшивания коллагена склеры. Эффективность просветляющего действия оценивали по увеличению коллимированного пропускания образцов склеры, помещенных в раствор просветляющего агента.

В качестве просветляющих агентов использовали вещества и растворы, применявшиеся ранее для просветления склеры в видимой и ближней ИК областях и для просветления других тканей и не имеющие полос поглощения в области 370 нм. Были использованы растворы глюкозы в дистиллированной воде концентрацией 54% и 40% по массе. Эффективность просветляющего действия растворов глюкозы оказалась невысока: в растворе большей концентрации коллимированное пропускание увеличилось в течение 35 мин с 0% до 1.4%, в растворе глюкозы концентрацией 40% в течение 45 мин коллимированное пропускание увеличилось всего до 0.22%. 50% (по объему) раствор глицерина дал сравнимую величину увеличения пропускания за счет просветления – до 0.5%. Как и в случае глюкозы, увеличение концентрации просветляющего агента привело к увеличению эффективности просветления на 370 нм: воздействие 75% раствора увеличивает коллимированное пропускание склеры до 4.8%. Наилучшие результаты дало применение чистого 100% глицерина (ЧДА ГОСТ 6259-75), здесь через 30 минут пребывания склеры в просветляющем агенте величина коллимированного пропускания составила 23.6%. Далее, при исследовании влияния оптического просветления на усиление механических свойств свиной склеры при рибофлавин / УФ фотосшивании коллагена был использован именно чистый глицерин.

В ходе данной работы влияние оптического просветления на эффективность образования фотосшивок в склере оценивалось непосредственно по механическим свойствам образцов склеры *ex vivo*.

Механические свойства изучались с помощью динамического механического анализатора DMA Q800. В данном приборе к образцу склеры, расположенному вертикально между неподвижным и подвижным зажимами, прикла-



дывали силу, увеличивающуюся с постоянной скоростью, и регистрировали изменение длины образца. Из результатов измерений, учитывая изменение поперечного сечения образца в предположении постоянного объема, были рассчитаны механическое напряжение в образце и его относительное удлинение. Механическое напряжение  $\sigma$  рассчитывалось по формуле  $F$ :

$$\sigma = \frac{F(l_0 + \Delta l)}{S_0 l_0}, \quad (1)$$

где  $F$  – сила, прикладываемая к образцу,  $l_0$  – начальная длина образца,  $\Delta l$  – изменение длины образца, измеряемое прибором,  $S_0$  – начальная площадь поперечного сечения образца.

Относительное удлинение образца  $\varepsilon$  рассчитывалось согласно определению этой величины:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \cdot 100\%. \quad (2)$$

Для оценки и сравнения механических свойств (жесткости) образцов склеры определяли эффективное значение модуля Юнга  $E$  при относительном удлинении 18% (при расчете относительное удлинение берется не в процентах, а в долях единицы) по формуле

$$E_{0.18} = \left. \frac{d\sigma}{d\varepsilon} \right|_{\varepsilon=0.18}. \quad (3)$$

Эксперименты проводились на размороженной склере свиньи. Перед экспериментами склера тщательно очищалась от эписклеральной ткани с наружной стороны и от сосудистой оболочки и сетчатки с внутренней и разрезалась в сагитальном направлении на полосы шириной 4 мм, толщина образцов в среднем составляла 0,9 мм.

На первом этапе биомеханических исследований было изучено влияние просветляющего агента – глицерина, на механические свойства склеры, для чего с помощью динамического механического анализатора сравнивались механические свойства образца склеры свиньи, хранившегося после препарирования в физиологическом растворе, образца просветленного 100% глицерином в течение 1 часа, и этого же образца, подвергнутого после механических измерений регидратации в физиологическом растворе в течение суток. Из экспериментальных данных, полученных с помощью анализатора DMA Q800, для всех трех образцов были рассчитаны значения механического напряжения и относительного удлинения образцов и построены графики их зависимости (рис. 1).

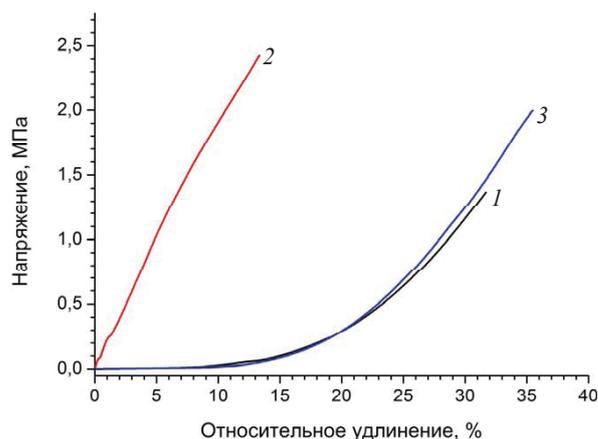


Рис. 1. Связь механического напряжения с относительным удлинением для: 1 – образца свиной склеры в физиологическом растворе, 2 – образца свиной склеры, просветленного 100% глицерином, 3 – просветленного образца свиной склеры, регидратированного в физиологическом растворе

Значительное удлинение образца склеры из физиологического раствора (кривая 1) при малой приложенной силе может быть в большей степени обусловлено переориентацией (во внутренних слоях стромы) коллагеновых волокон (пучков) и «расправлением» их волнистой структуры (во внешних слоях стромы), а не их осевым растяжением. Из рис. 1 видно, что характеристика образца, подвергнутого просветлению в 100% глицерине (кривая 2), не имеет такого начального участка и начиная с самых малых деформаций практически подчиняется закону Гука. Линейная аппроксимация экспериментальной зависимости дает для модуля Юнга значение 18,8 МПа, в то время как эффективное значение модуля Юнга при относительном удлинении 18% для образца из физиологического раствора составило всего 4,2 МПа. Это свидетельствует о значительном увеличении жесткости склеры при просветлении 100% глицерином, что может быть связано с дегидратацией и замещением воды глицерином и в имеющих гликопротеиновую и гликозаминогликановую природу поверхностях коллагеновых волокон, и в основном веществе стромы (содержащем гликозаминогликаны), которые в нативном состоянии не препятствуют скольжению волокон друг относительно друга при переориентации и «расправлении». Этот эффект по сути повторяет изменение механических свойств склеры при высушивании.

Такое значительное увеличение жесткости при просветлении оказалось в высокой степени обратимым. Кривая 3, характеризующая меха-



нические свойства регидратированного образца хорошо совпадает с характеристикой нативного образца (кривая 1). Для регидратированного в физиологическом растворе образца склеры эффективное значение модуля Юнга при относительно удлинении 18% составило 4.6 МПа. Таким образом, можно утверждать, что само по себе оптическое просветление глицерином, сопровождающееся регидратацией, не приводит к изменению механической прочности (жесткости) склеры.

Для изучения влияния оптического просветления на эффективность методики образования сшивок, описанной в работах [5–8], были сравнены механические свойства образца свиной склеры, обработанного 0.1% раствором рибофлавина и ультрафиолетовым излучением длиной волны 370 нм и образца склеры (обработанного 0.1% раствором рибофлавина), просветленного 100% глицерином, а затем подвергнувшегося УФ облучению. Для этого два образца размороженной свиной склеры помещались в 0.1% раствор рибофлавина на 1 час. После этого один из образцов просветляли в течение 1 часа. Из-за возможного вымывания рибофлавина глицерином из склеры оптическое просветление склеры образца проводилось в растворе рибофлавина в 100% глицерине. Затем оба образца склеры облучались ультрафиолетом в течение 30 мин. Для этого с помощью фильтра УФС 6 из спектра излучения дуговой ксеноновой лампы выделялась ультрафиолетовая область с максимумом излучения на длине волны 370 нм. Плотность ультрафиолетового излучения на поверхности образцов составила 14 мВт/см<sup>2</sup>. После облучения оба образца помещались в физиологический раствор на сутки (для регидратации просветленного образца), затем проводились измерения их механических свойств. Полученные зависимости механическое напряжение – относительное удлинение образцов представлены на рис. 2. На этом же рисунке в качестве контроля приведены данные для исходного, не подвергнутого сшивке, образца.

Из полученных зависимостей были рассчитаны эффективные значения модуля Юнга при относительном удлинении 18%, которые составили: 8.3 МПа для образца, обработанного по обычной методике получения рибофлавин/УФ сшивок, 21.9 МПа для образца склеры, просветленного глицерином перед проведением УФ облучения, а затем регидратированного в течение суток, и 3.4 МПа для контрольного образца, хранившегося в физиологическом растворе.

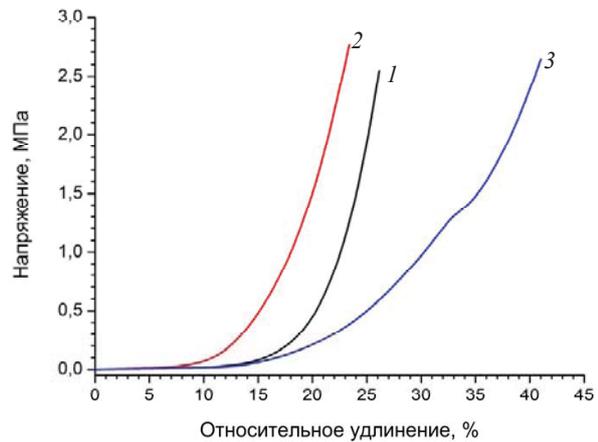


Рис. 2. Связь механического напряжения с относительным удлинением для: 1 – образца свиной склеры, обработанного раствором рибофлавина и ультрафиолетом, 2 – образца свиной склеры, обработанного раствором рибофлавина, просветленного 100% глицерином и облученного ультрафиолетом, 3 – образца свиной склеры в физиологическом растворе

Полученные результаты нужно, несомненно, рассматривать как предварительные и оценочные, и необходимо проведение систематических исследований режимов диффузии рибофлавина, просветления и УФ облучения с целью оптимизации методики укрепления склеры путем фотосшивания коллагена. Однако даже в рамках обсуждения этих первых результатов можно говорить о том, что оптическое просветление в идентичных условиях обработки образца склеры рибофлавином и последующего УФ облучения приводит к большему увеличению эффективной жесткости склеры при малой относительной деформации. Такое увеличение жесткости может быть обусловлено не только повышением количества образовавшихся фотосшивок, но и фиксацией при образовании сшивок изменений в микроструктуре коллагеновых волокон под действием глицерина [15] и изменений, связанных с дегидратацией ткани при просветлении.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (№ НШ-703.2014.2).*

#### Список литературы

1. *McBrien N. A., Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia // Progress in retinal and eye research. 2003. Vol. 22, № 3. P. 307–338.*



2. Morgan I. G., Ohno-Matsui K., Saw S. M. Myopia // Lancet. 2012. Vol. 379, № 9827. P. 1739–1748.
3. Bum B. B. Строение зрительной системы человека. М. ; Одесса : Астропринт, 2003. 650 с.
4. Komai Y., Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera // Investigative ophthalmology & visual science. 1991. Vol. 32, № 8. P. 2244–2258.
5. Wollensak G., Spoerl E. Collagen crosslinking of human and porcine sclera // J. of Cataract & Refractive Surgery. 2004. Vol. 30, № 3. P. 689–695.
6. Wollensak G., Iomdina E. Long – term biomechanical properties of rabbit sclera after collagen crosslinking using riboflavin and ultraviolet A (UVA) // Acta ophthalmologica. 2009. Vol. 87, № 2. P. 193–198.
7. Zhang Y., Li Z., Liu L., Han X., Zhao X., Mu G. Comparison of Riboflavin/Ultraviolet-A Cross-Linking in Porcine, Rabbit, and Human Sclera // BioMed research international. 2014. Vol. 2014.
8. Wollensak G., Iomdina E., Dittert D. D., Salamatina O., Stoltzenburg G. Cross – linking of scleral collagen in the rabbit using riboflavin and UVA // Acta Ophthalmologica Scandinavica. 2005. Vol. 83, № 4. P. 477–482.
9. Тучин В. В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. М. : Физматлит, 2013. 812 с.
10. Tuchin V. V., Maksimova I. L., Zimnyakov D. A., Kon I. L., Mavlyutov A. H., Mishin A. A. Light propagation in tissues with controlled optical properties // J. of Biomedical Optics. 1997. Vol. 2, № 4. P. 401–417.
11. Bashkatov A. N., Tuchin V. V., Genina E. A., Sinichkin Y. P., Lakodina N. A., Kochubey V. I. Human sclera dynamic spectra: in-vitro and in-vivo measurements // BiOS'99 Intern. Biomed. Optics Symp. Intern. Society for Optics and Photonics, Proceedings of SPIE. 1999. Vol. 3591. P. 311–319.
12. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Оптическое просветление склеры глаза in vivo под действием глюкозы // Квант. электр. 2006. Т. 36, № 12. С. 1119–1124.
13. Tuchin V. V., Bashkatov A. N., Genina E. A., Sinichkin Y. P. Scleral tissue clearing effects // Proceedings of SPIE. 2002. Vol. 4611. P. 54–58.
14. Zaman R. T., Rajaram N., Nichols B. S., Rylander H. G., Wang T., Tunnell J. W., Welch A. J. Changes in morphology and optical properties of sclera and choroidal layers due to hyperosmotic agent // J. of Biomedical Optics. 2011. Vol. 16, № 7. P. 077008-1–077008-14.
15. Yeh A. T., Choi B., Nelson J. S., Tromberg B. J. Reversible dissociation of collagen in tissues // J. of Investigative Dermatology. 2003. Vol. 121, № 6. P. 1332–1335.

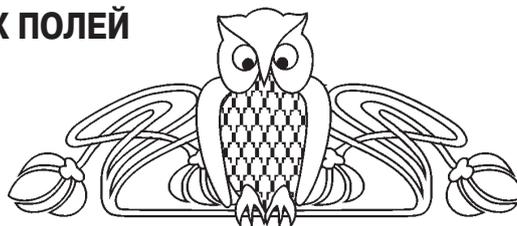
УДК 539.182/184, 519.677

## РАСЧЕТ МАСШТАБИРУЮЩИХ МНОЖИТЕЛЕЙ ДЛЯ КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКИХ СИЛОВЫХ ПОЛЕЙ

К. В. Березин, А. В. Новоселова, М. Л. Чернавина,

**В. И. Березин**, **В. В. Новоселов**

Саратовский государственный университет  
E-mail: nusena1975@mail.ru



Предложена оригинальная методика расчета масштабирующих множителей для квантово-механических силовых полей, не требующая вычисления производных от частот по масштабирующим множителям и позволяющая проводить масштабирование силового поля в зависимых естественных координатах.

**Ключевые слова:** квантово-механические расчеты, колебательные спектры молекул, эмпирическая коррекция, силовые постоянные молекул, волновые числа, метод масштабирующих множителей Пулаи.

### Calculation of Scale Factors for Quantum-mechanical Force Fields

К. V. Berezin, A. V. Novoselova, M. L. Chernavina,  
**В. I. Berezin**, **V. V. Novoselov**

A computer-assisted method for the calculation of scaling factors for refining the quantum-mechanical force fields of polyatomic molecules

by the Pulay technique is suggested. The method is an iteration procedure and does not involve the calculation of derivatives of the frequencies of vibrations with respect to the scaling factors.

**Key words:** quantum chemical calculations, vibrational spectra of molecules, empirical correction, harmonic force fields, wavenumbers, Pulay's scaling method.

DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-4-41-44

### Введение

В последнее время благодаря повышению производительности компьютеров и развитию теории, особенно теории функционала плотности [1], появилась возможность получать надежные силовые и электрооптические поля сложных многоатомных молекул, содержащих в своем составе более 100 атомов первого и второго