

УДК 535.36:612.085.1

# Сравнительное исследование физического, химического и мультимодального подходов к усилению транспорта наночастиц в коже с модельным дерматитом

Э.А. Генина<sup>1</sup>, Г.С. Терентюк<sup>1,2,3</sup>, А.Н. Башкатов<sup>1</sup>, Н.А. Михеева<sup>2</sup>, Е.А. Колесникова<sup>1</sup>,  
М.В. Баско<sup>3</sup>, Б.Н. Хлебцов<sup>4</sup>, Н.Г. Хлебцов<sup>1,4</sup>, В.В. Тучин<sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет, 432000, Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112

<sup>4</sup>ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

<sup>5</sup>ФГБУ науки Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028, Саратов, ул. Рабочая, 24

<sup>6</sup>Университет Оулу, 90014, Оулу, п/я 4500, Финляндия

E-mail: eagenina@yandex.ru

Поступила в редакцию: 19.02.2014

Принята в печать: 11.06.2014

В работе представлен сравнительный анализ комбинированного и отдельного влияния ультразвука и диметилсульфоксида (ДМСО) на транспорт суспензии золотых наночастиц в интактной и поврежденной коже на основе данных оптической когерентной томографии и гистохимического анализа. В качестве модели повреждения рогового слоя эпидермиса при различных патологических изменениях кожи использовался экспериментальный аллергический контактный дерматит. Исследования проведены на лабораторных аутбредных крысах. Показано, что оптимальным методом усиления трансдермального транспорта иммерсионной основы суспензии является мультимодальное физико-химическое воздействие (комбинация ДМСО и ультразвукофореза), причем эффективность оптического просветления дермы как при наличии, так и при отсутствии рогового слоя эпидермиса приблизительно одинакова. Для усиления транспорта наночастиц в кожу при ее патологических изменениях, связанных с повреждением защитного барьера, достаточно использование только УЗ-воздействия.

## COMPARATIVE STUDY OF THE PHYSICAL, CHEMICAL, AND MULTIMODAL APPROACHES TO ENHANCING NANOPARTICLE TRANSPORT IN THE SKIN WITH MODEL DERMATITIS

This paper presents a comparative analysis of the combined and separate influence of ultrasound and DMSO on the transport of a gold nanoshell suspension in intact and injured skin from data on optical coherence tomography and histochemical analysis. Experimental allergic contact dermatitis was used to model injury to the stratum corneum during various pathological changes in the skin. The studies were performed on outbred laboratory rats. It is shown that the best method for enhancing transdermal transport of an immersion liquid is multimodal physical and chemical impact (a combination of DMSO and ultrasonophoresis); the effectiveness of optical clearing of the dermis both in the presence and absence of the stratum corneum is approximately the same. To enhance the transport of nanoparticles into the skin when it undergoes pathological changes related to injuries of the protective barrier, exposure to ultrasound is sufficient.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наноразмерные материалы все чаще используются в биомедицинских исследованиях. Особое место среди таких материалов, применяемых для диагностических и терапевтических целей, занимают золотые наночастицы (ЗНЧ). В частности, ЗНЧ используются в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов, генетического материала, антигенов, а также как медиатор при лазерном фототермолизе или диагностический маркер при терапии опухолей [1, 2]. Внимание многих исследователей нацелено на изучение поведения наночастиц при контакте с поверхностью здоровой и поврежденной кожи и их взаимодействия с различными слоями кожи, что в конечном итоге может привести к разработке «идеального» доставщика или диагностического средства с точки зрения физико-химических параметров наночастиц [3].

Многочисленные исследования [3–5] показали, что здоровая кожа является барьером для проникновения веществ с высокой молекулярной массой, в том числе и металлических наночастиц. Защитные свойства кожи обеспечиваются прочным и плотным роговым слоем, макрофагальной системой эпидермиса и дермы, которая включает клетки Лангерганса и гистиоциты. Установлено, что опосредо-

ванная наночастицами доставка препаратов в эпидермис и дерму без нарушения их целостности малоэффективна [5]. При нарушении целостности кожного барьера, например, в нативной или патологически измененной коже, степень проницаемости кожи повышается [6].

Проницаемость кожи для препаратов, содержащих наночастицы, может быть повышена как химическими методами [7–9], так и с помощью физических воздействий, например, УФ-излучения [10], гипертермии [11], ионофореза [12], дермапорации [13], ультрафонофореза [14] и др. При этом сочетание различных физических или физико-химических подходов способствует более эффективному проникновению наночастиц через кожный барьер [15, 16].

УФ-излучение, как известно, оказывает негативное влияние на барьерную функцию кожи, вызывая биофизические и морфологические изменения липидов эпидермиса. Однако, по мнению авторов работы [10], проникновение наночастиц в кожу было обнаружено в основном в области волосяных фолликулов, и они определяют это как еще один возможный механизм переноса частиц.

Гипертермия как метод переноса наночастиц исследовалась очень ограничено. И эти результаты не дают возможно-

сти полной оценки влияния термовоздействия, при котором не происходит разрушения эпидермиса, а лишь ускоряются химические реакции [11].

Ионофорез представляет собой механизм для повышения проникновения гидрофильных и заряженных молекул через кожу за счет применения постоянного тока. Система трансдермальной доставки применялась для стабилизированных цитратом отрицательно заряженных ЗНЧ через кожу человека [12]. При нулевом напряжении ЗНЧ локализовались на поверхности эпидермиса, а при приложении небольшого напряжения ЗНЧ проходили по межклеточному пути. К сожалению, дальнейший перенос в дерму не был показан [12].

Дермапорация является новой трансдермальной технологией доставки лекарственных средств, в которой используется импульсное электромагнитное поле. Эксперименты по повышению проникновения десяти нанометровых ЗНЧ в эпидермис кожи человека показали, что потенциальным механизмом для улучшения транспорта является формирование переходных пор, через которые частицы могут диффундировать [13]. При этом недавние исследования по проникновению ЗНЧ через кожу в зависимости от поверхностного заряда показали, что частицы с отрицательным зарядом проникают лучше, чем положительно заряженные [17].

Использование низкочастотного ультразвукового (УЗ) воздействия позволяет улучшить адресную доставку микро- и наночастиц в биоткани [18]. Однако для преодоления эпидермального барьера требуются дополнительные воздействия, такие, как лазерная фракционная микроабляция [15] или химические усилители диффузии через эпидермис [16].

Эксперименты на модельных объектах по проницаемости интактной и поврежденной кожи для ЗНЧ при простой диффузии показали, что проникновение возможно, но не выявили количественной разницы [6].

При изучении влияния толуола в качестве дисперсионной среды на проникновение через кожу человека ЗНЧ не было выявлено никаких радикальных изменений в межклеточном липидном составе, которые могли бы способствовать проникновению наночастиц в кожу [7].

Из известных соединений, усиливающих трансдермальную диффузию, в том числе и низкомолекулярных, в настоящее время наиболее известным является серосодержащее соединение диметилсульфоксид (ДМСО). Механизм действия ДМСО обусловлен его способностью растворять липиды рогового слоя, увеличивая, таким образом, содержание в нем воды [8, 9]. Благодаря этому свойству ДМСО повышает скорость трансдермального проникновения как водорастворимых, так и жирорастворимых веществ [8, 9].

Целями настоящей работы являются исследование проницаемости интактной и поврежденной кожи для золотых наночастиц, а также сравнительный анализ физического (ультразвук), химического (ДМСО) и мультимодального подхода к усилению транспорта наночастиц в кожу, лишенной защитного эпидермального барьера и при наличии этого барьера.

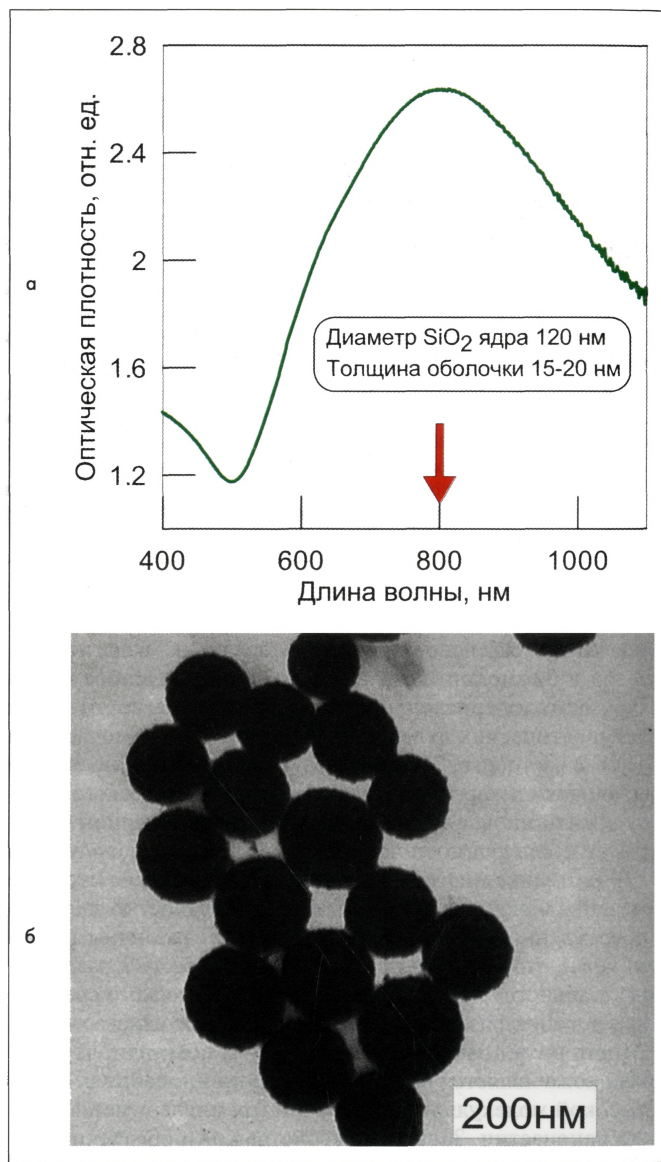
**МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ**

Суспензия золотых наночастиц с диаметром силикатного ядра 120 нм и толщиной оболочки 20 нм была синтезирована как описано ранее [19]. В работе использовался концентрированный коллоид наночастиц с оптической плотностью в диапазоне длин волн 800–1000 нм около 20 (что соответствует  $10^{11}$  частиц в 1 мл). Для увеличения биосовместимости и предотвращения формирования конгломератов частиц их поверхность была модифицирована тиолированным полиэтиленгликолем. На рис. 1 представлены экспериментальный

спектр экстинкции и электронно-микроскопическое изображение образца золотых наночастиц.

Приготовление суспензии коллоида ЗНЧ для наружного применения осуществляли следующим образом. Была приготовлена смесь 95%-ного водного раствора глицерина (ЗАО «База № 1 химреактивов», РФ) (показатель преломления  $n = 1.467$ ) и полиэтиленгликоля-400 (ПЭГ-400, молекулярный вес 400, Aldrich, США) ( $n = 1.463$ ) в равных соотношениях. Общий объем раствора составлял 920 мкл ( $n = 1.465$ ). К полученному раствору по каплям добавляли концентрированные наночастицы (1 мл коллоида). К 1 мл готового коллоида добавлялось 100 мкл ДМСО (99%, Sigma, США) ( $n = 1.477$ ). Затем всю систему гомогенизировали в ультразвуковой ванне (Elmasonic One, Германия) в течение 10 мин. Показатели преломления измерялись на рефрактометре ИРФ-454Б2М («ЛОМО», Россия) при комнатной температуре ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) по стандартной методике.

Повреждение целостности рогового слоя эпидермиса наблюдается при различных патологических состояниях, в том числе дерматитах различной этиологии, злокачествен-



**РИСУНОК 1** | Спектр экстинкции (а) и электронно-микроскопические изображения (б) золотых наночастиц

ных новообразованиях кожи, диабете и др. В качестве модели повреждения кожи может использоваться экспериментальный аллергический контактный дерматит (АКД) у крыс, сенсибилизированных по методике П.М. Залкан [20] 2,4-динитрохлорбензолом (ДНХБ).

Эксперименты были выполнены на 24 самцах белых аутобредных лабораторных крыс, масса которых в среднем составляла 150–200 г. Кожа белых лабораторных крыс близка по строению к коже человека [21], поэтому на этих животных можно моделировать различные дерматологические заболевания.

Для моделирования АКД три капли 5% масляного раствора ДНХБ однократно в виде аппликации наносили на очаг сенсибилизации (поверхность спины, предварительно депилированная кожа) с дополнительным нанесением на семь других участков кожи по капле 1% раствора. На 8-е сут формировалась воспалительная реакция с тотальным некрозом эпидермиса и образованием субэпидермальных пузырей.

Эксперименты проводились на 9 сут от начала моделирования АКД. Животные были разделены на 8 групп (по трое животных в каждой группе): с I по IV группы составляли животные с АКД и с V по VIII группы – с неповрежденной кожей. Неповрежденная кожа предварительно депилировалась. У каждого животного на спине выделялось по два участка. Для исследования проницаемости кожи для ЗНЧ на оба участка кожи экспериментальных животных из I и V групп наносили суспензию, содержащую ЗНЧ в комплексе с ДМСО, а из II и VI групп – суспензию, содержащую ЗНЧ без ДМСО. Время экспозиции на одном из участков составляло 20 мин. Второй участок для усиления трансдермального переноса ЗНЧ подвергался УЗ-воздействию излучателем Dinatron 125 (Dinatronics Co., США) с частотой 1 МГц, мощностью 1.1 Вт и общей длительностью 4 мин (2 раза по 2 мин). Контрольными служили III, IV, VII и VIII группы, для которых исследовалась проницаемость поврежденной и здоровой кожи для иммерсионного раствора, являющегося основой суспензии, без ЗНЧ. При этом для III и VII групп в состав раствора включался ДМСО, а для IV и VIII – нет. Обработка исследуемых участков кожи для данных групп осуществлялась аналогично описанному выше.

Для неинвазивного определения зон аккумуляции ЗНЧ в коже и оценки коэффициента ослабления зондирующего света использовали оптическую когерентную томографию, которую проводили для животных всех экспериментальных групп с помощью спектрального оптического когерентного томографа (ОКТ) OCP930SR 022 (Thorlabs Inc., США) с рабочей длиной волны  $930 \pm 5$  нм и шириной полосы на полувысоте пика излучения  $100 \pm 5$  нм. Оптическая мощность зондирующего излучения составляла 2 мВт, область сканирования 6 мм. Аксиальное и латеральное разрешение прибора составляло соответственно 6.2 и 9.6 мкм. Сканирование каждого участка осуществлялось до нанесения исследуемого агента (суспензии ЗНЧ или иммерсионного раствора без ЗНЧ) и после обработки: 20-минутной экспозиции агента или УЗ-воздействия.

После окончания экспериментов животных из I и V групп подвергали декапитации для дальнейшего гистохимического исследования.

Полный коэффициент ослабления света на участке биоткани  $\mu_t$ , представляющий собой сумму коэффициентов поглощения  $\mu_a$  и рассеяния  $\mu_s$ , может быть получен методом подбора параметров аппроксимирующей кривой, рассчитанной с помощью соответствующей модели, на интересующем участке в области наклона А-скана ОКТ-сигнала [22–24].

Модель однократного рассеяния основана на предположении, что только свет, испытавший однократное рассеяние, сохраняет когерентные свойства и вносит свой вклад в формирование ОКТ-сигнала. ОКТ-сигнал в данном случае определяется как [22–24]:

$$\left( \langle i^2(z) \rangle \right)^{1/2} \approx \left( \langle i^2 \rangle_0 \right)^{1/2} \left( \exp(-2\mu_t z) \right)^{1/2}, \quad (1)$$

где  $i(z)$  – ОКТ-сигнал,  $z$  – расстояние в глубине ткани, откуда пришел отраженный сигнал.

Модель однократного рассеяния справедлива как для слабо рассеивающих биотканей, так и в области поверхностных слоев биоткани, где режим однократного рассеяния назад является преобладающим. К слабо рассеивающим тканям можно отнести биоткани с оптической толщиной

$$\tau = \int_0^s \mu_t ds < 4 \quad [22].$$

В этом случае результаты расчетов  $\mu_s$  (или  $\mu_t$ ) близки к значениям, полученным из результатов оптических измерений с помощью спектрофотометрии [24, 25]. Таким образом, значение  $\mu_t$  поверхностных слоев кожи (до 100 мкм) может быть, на наш взгляд, адекватно оценено с помощью модели однократного рассеяния.

Известно, что результатом ОКТ-исследования является измерение зависимости интенсивности ОКТ-сигнала исследуемой ткани,

$$R(z) \propto \left( \langle i^2(z) \rangle \right)^{1/2},$$

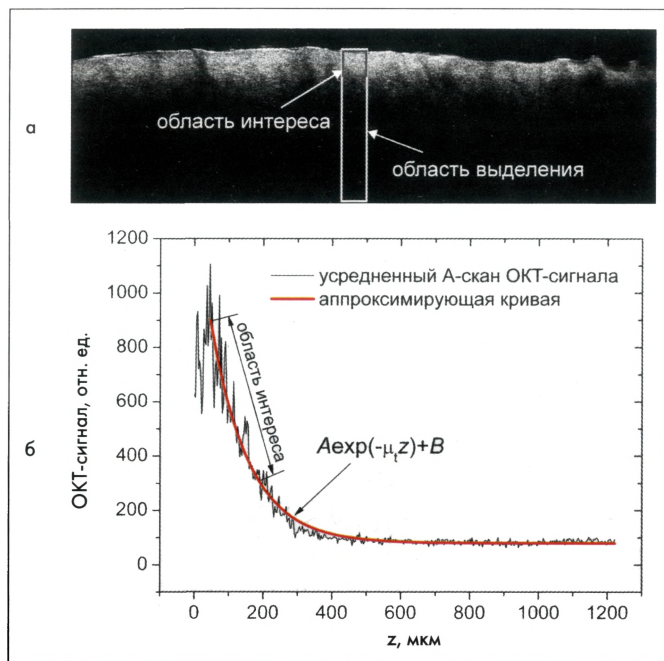
от глубины  $z$ . Интенсивность ОКТ-сигнала зависит от отражательной способности  $\alpha(z)$  биоткани на заданной глубине и полного коэффициента ослабления  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  биоткани. В соответствии с моделью однократного рассеяния отраженная мощность пропорциональна  $\exp(-\mu_t z)$  [22], т.е. может быть аппроксимирована выражением:

$$R(z) = A \exp(-\mu_t z) + B, \quad (2)$$

где  $A$  – коэффициент пропорциональности, равный  $P_0 \alpha(z)$ ,  $P_0$  – оптическая мощность в пучке, падающем на поверхность биоткани,  $\alpha(z)$  определяется локальным показателем преломления и локальной способностью биоткани рассеивать свет назад,  $B$  – фоновый сигнал.

На рис. 2 представлены область анализа на ОКТ-изображении, усредненный А-скан ОКТ-сигнала дермального слоя кожи крысы *in vivo* и аппроксимирующая кривая, построенная с использованием модели однократного рассеяния. Для анализа выбиралась область на В-скане с плоской поверхностью (область выделения на рис. 2а). Ширина исследуемой области составляла 51 А-скан (приблизительно 150 мкм). Область интереса включала слой верхней части дермы с оптической глубиной приблизительно 140 мкм, что соответствовало физической глубине ~100 мкм, считая средний показатель дермы равным 1.4 [26]. Эта глубина, на которой интенсивность ОКТ-сигнала уменьшается в  $e$  раз по сравнению с сигналом от поверхности (рис. 2б). Подбор коэффициентов в уравнении (2) для аппроксимации экспериментальной кривой позволяет оценить коэффициент полного ослабления света дермой [27].

Биопсию кожи животных из I и V групп проводили после декапитации. Все эксперименты, уход и содержание животных осуществлялись в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 года Европейского парламента и Совета



**РИСУНОК 2** | ОКТ-изображение участка дермы крысы *in vivo* (В-скан) (а); усредненный А-скан ОКТ-сигнала и аппроксимирующая кривая, построенная с использованием модели однократного рассеяния:  $R(z) = A \exp(-\mu_c z) + B$  (б)

Европейского союза «О защите животных, используемых для научных исследований» [28] и «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник от 06.04.1973» [29].

Экспериментальный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. С помощью микротомы МПС-2 («Точмедприбор», Украина) изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для визуализации зон накопления ЗНЧ в тканевых структурах кожи проводили гистохимическое окрашивание срезов 0.2% водным раствором азотнокислого серебра в смеси с 0.5% раствором гидрохинона на цитратном буфере (рН = 3.8) [30]. Срезы дополнительно окрашивались толуидиновым синим. Описание и сравнительно-морфологический анализ структуры кожи проводили с помощью микроскопа Motic В3 (Motic, КНР).

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОКТ-ИССЛЕДОВАНИЯ**

Рис. 3 демонстрирует ОКТ-изображения здоровой кожи экспериментального животного и кожи с АКД. На ОКТ-изображении интактной кожи (рис. 3а) хорошо визуализируется эпидермис (отмечен буквой Э), на поверхности которого наблюдается роговой слой (РСЭ), четко диффе-

ренцируется граница между эпидермисом и дермой (отмечена буквой Д).

В отличие от здоровой кожи, на изображении кожи с модельным АКД хорошо виден поврежденный РСЭ. На пораженных участках наблюдалось либо отсутствие эпидермального слоя и оголение дермы (см. рис. 3б), либо поднятие участков эпидермиса (см. рис. 3в). Наличие приподнятых участков эпидермиса на поверхности кожи с АКД ослабляло интенсивность светового потока, проникающего в глубь кожи за счет многократного отражения света от границ раздела воздуха и эпидермальной ткани. Как видно на рис. 3в, дополнительное рассеяние, создаваемое рыхлой структурой эпидермальной ткани, практически полностью препятствовало проникновению зондирующего излучения в дерму. Поэтому для расчета коэффициента ослабления дермы кожи с модельным АКД были взяты участки с оголенной дермой.

Значения коэффициента ослабления света дермой при различных способах внедрения суспензии ЗНЧ и иммерсионного раствора представлены в таблице.

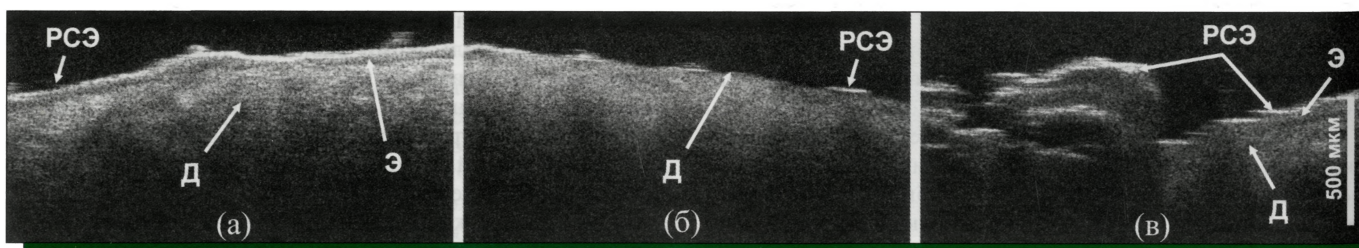
После нанесения на поверхность кожи с модельным АКД исследуемой суспензии и ее 20-минутной экспозиции для I и II групп экспериментальных животных наблюдалось соответственно снижение значений  $\mu_c$  в среднем на 3 и 2%. Двадцатиминутная экспозиция суспензии ЗНЧ на неповрежденной коже (V и VI группы) также вызывала небольшое снижение значений  $\mu_c$ . Такое изменение оптических параметров можно отнести к появлению на поверхности кожи отражающего экрана, роль которого играет слой суспензии ЗНЧ.

Более значительное снижение значений  $\mu_c$  наблюдалось в контрольных группах: в III и IV группах – приблизительно на 20%, в VII группе – на 6%. Только в VIII группе снижения значения  $\mu_c$  находилось в пределах погрешности (1%).

Еще более существенные различия между группами, обработка которых проводилась суспензией ЗНЧ и иммерсионным раствором, наблюдались после однократного и двукратного нанесения того или иного агента и УЗ-воздействия. Для кожи с модельным АКД наблюдался рост значения коэффициента ослабления на 4–7% (I и II группы) при использовании в качестве исследуемого агента суспензии ЗНЧ, что свидетельствовало об увеличении светорассеяния в дерме. Для интактной кожи значение коэффициента ослабления либо снизилось на 10% (V группа), либо практически не изменилось (VI группа). Во всех контрольных группах, напротив, значение  $\mu_c$  существенно снизилось. Так, для группы III после однократной и двукратной УЗ-обработки уменьшение составило соответственно 37 и 48%, для группы IV – 28 и 42%, для группы VII – 27 и 45% и для группы VIII – 15 и 23%.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ГИСТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

На рис. 4–7 представлена серия микрофотографий гистологических срезов кожи крысы после различных способов внедре-



**РИСУНОК 3** | ОКТ-изображения здоровой кожи (а) и кожи с аллергическим контактным дерматитом (б и в). Обозначения: РСЭ – роговой слой эпидермиса, Э – эпидермис, Д – дерма

Коэффициент ослабления дермы ( $\mu, \text{см}^{-1}$ ) при различных способах внедрения суспензии золотых наночастиц и иммерсионного раствора

Тип воздействия	Экспериментальная группа							
	Кожа с АКД				Здоровая кожа			
	Суспензия с ЗНЧ		Иммерсионный раствор		Суспензия с ЗНЧ		Иммерсионный раствор	
	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО	с ДМСО	без ДМСО
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Без воздействия	93 ± 12	93 ± 6	94 ± 10	91 ± 6	93 ± 5	101 ± 18	95 ± 2	97 ± 9
20-минутная экспозиция без УЗ	90 ± 9	91 ± 8	78 ± 2	76 ± 4	91 ± 7	99 ± 14	90 ± 9	96 ± 8
2-минутная экспозиция с УЗ	98 ± 13	97 ± 13	68 ± 4	71 ± 7	92 ± 11	104 ± 11	75 ± 2	84 ± 9
4-минутная экспозиция с УЗ	102 ± 22	98 ± 10	63 ± 2	64 ± 9	84 ± 9	102 ± 11	66 ± 4	79 ± 9

ния суспензии ЗНЧ. Рис. 4 демонстрирует микрофотографии срезов кожи с АКД после 20-минутной экспозиции суспензии ЗНЧ с ДМСО (I группа экспериментальных животных). На рис. 4а хорошо видно отсутствие эпидермиса на большом протяжении среза. В сохранившемся эпидермисе отсутствует базальная мембрана. Роговой слой эпидермиса разорван, содержит ядерные клетки. Клетки базального слоя в виде частокола. Наблюдается акантолиз – дегенеративные изменения клеток шиповатого слоя, выраженные в расплавлении межклеточных цитоплазматических связей.

Для дермы характерны резкие дистрофические изменения коллагеновых волокон, проявляющиеся в виде мукоидного набухания. В отдельных участках выражен мукоидный некроз волокон дермы. Сосуды полнокровны, в них определяется эритростаз. В подкожной мускулатуре наблюдается интерстициальный отек.

В результате окраски гистологических препаратов азотнокислым серебром скопления ЗНЧ визуализировались на поверхности кожи (отмечено на рис. 4б цифрой 1 и стрелками) и в незначительных количествах в дерме, преимущественно в области волосяных фолликулов (цифра 2 и стрелки).

Рис. 5 показывает микрофотографии срезов кожи с модельным АКД после однократного нанесения суспензии ЗНЧ с ДМСО и низкочастотного УЗ-воздействия в течение 2 мин (I группа). На рис. 5а видно, что эпидермис отсутствует в результате его десквамации, раневая поверхность обнажена. Для дермы характерны резкие дистрофические изменения коллагеновых волокон, проявляющиеся в виде мукоидного набухания. В отдельных участках выражен мукоидный некроз волокон дермы. Встречаются очаги кровоизлияния, представленные гемолизированными эритроцитами. Сосуды полнокровны, в них определяется эритростаз. Характерна нейтрофильная инфильтрация сосочкового слоя дермы. Из рис. 5б следует, что ЗНЧ выявляются в саркоплазме миосимпластов (цифра 1 и стрелки).

На рис. 6 представлены микрофотографии гистологических срезов кожи крысы с АКД после двукратного последовательного нанесения суспензии ЗНЧ с ДМСО и УЗ-воздействия (I группа). Рис. 6а показывает, что эпителий местами утолщен, на большей площади разрушен. Роговой слой отсутствует. Значительна лейкоцитарная инфильтрация сосочкового слоя дермы. Коллагеновые волокна утолщены, глубокие слои дермы отечны. Вены полнокровны. По ходу сосудов часты инфильтраты нейтрофилами и лимфоцитами.

Окраска гистологических препаратов азотнокислым серебром выявила хорошую проницаемость кожи для ЗНЧ, которые распределялись практически равномерно в сетчатом слое дермы, несколько концентрируясь в области сальных желез (на рис. 6б обозначены цифрой 1 и стрелками). Также в зна-

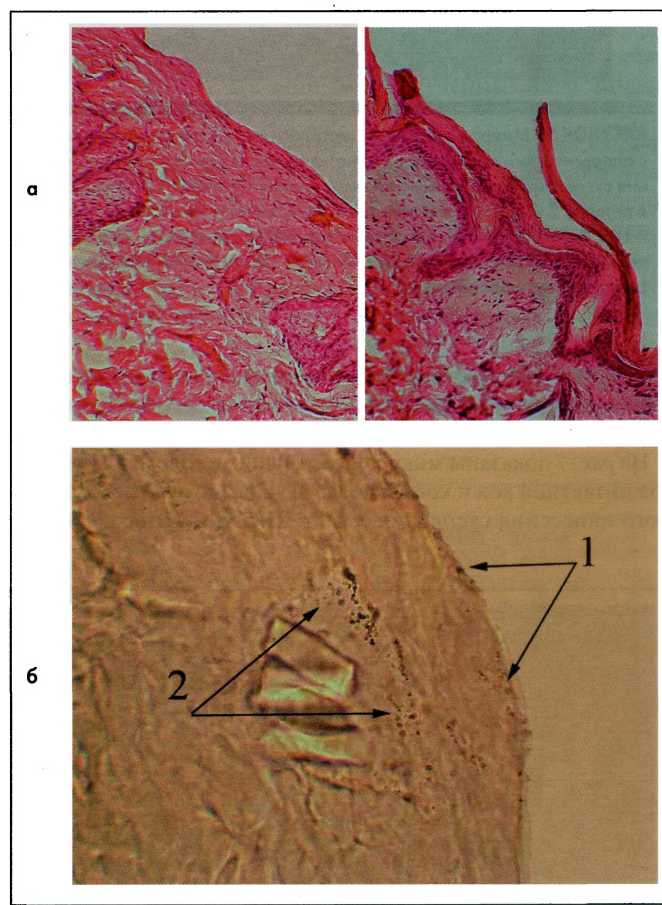
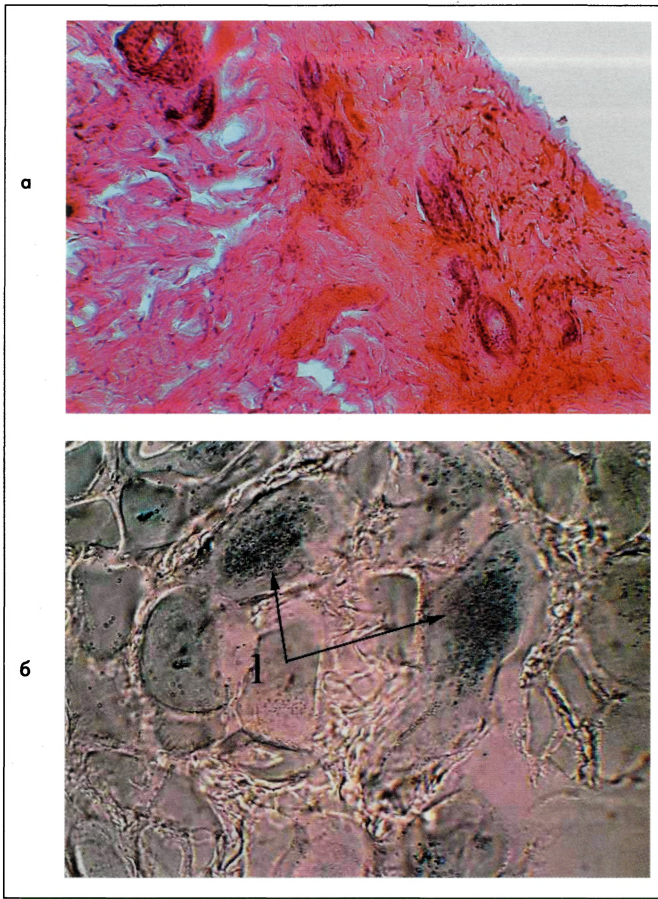


РИСУНОК 4 | Микрофотографии гистологических срезов кожи крысы с аллергическим контактным дерматитом после 20-минутной экспозиции суспензии золотых наночастиц: (а) – окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 160$ ; (б) – окраска азотнокислым серебром, увеличение  $\times 1000$ . Цифрами и стрелками обозначены скопления наночастиц золота



**РИСУНОК 5** | Микрофотографии гистологических срезов кожи крысы с аллергическим контактным дерматитом после однократного нанесения суспензии золотых наночастиц и низкочастотного УЗ-воздействия в течение 2 мин: (а) – окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 160$ ; (б) – окраска азотнокислым серебром с докраской толуидиновым синим, увеличение  $\times 600$ . Цифрой 1 и стрелками обозначены скопления наночастиц золота

чительных количествах ЗНЧ определялись в соединительнотканых прослойках подкожной мускулатуры (на рис. 6в обозначены цифрой 1 и стрелками).

На рис. 7 показаны микрофотографии гистологических срезов интактной кожи крысы после двукратного последовательного нанесения суспензии ЗНЧ с ДМСО и УЗ-воздействия

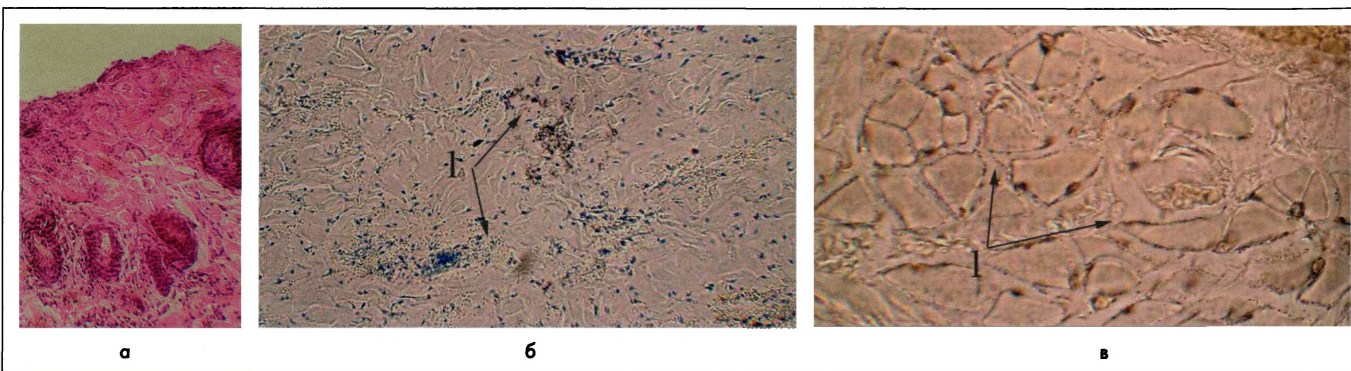
(V группа). Гистология кожи соответствует здоровой коже. Роговой слой участками разрушен. Дерма незначительно отечна, в сосочковом слое рыхлая лейкоцитарная инфильтрация. Периваскулярная инфильтрация характерна для поверхностных и глубоких сосудов дермы (рис. 7а).

Из рис. 7б следует, что ЗНЧ в следовых количествах определялись в пограничной зоне между эпидермисом и дермой, редко в дерме. Цифрой 1 и стрелками отмечены скопления ЗНЧ на поверхности кожи и в волосяном фолликуле.

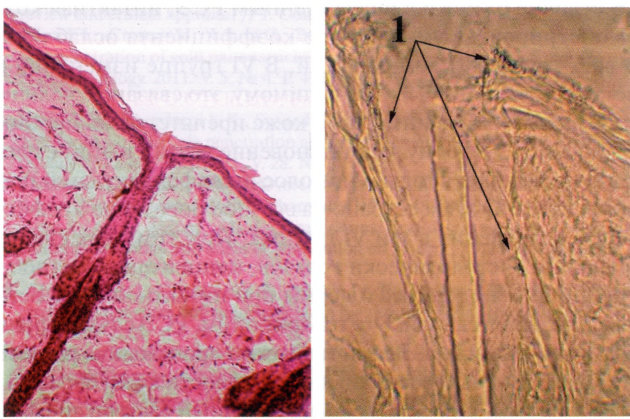
**ОБСУЖДЕНИЕ**

Среди многочисленных методов исследования транспорта наночастиц в различных биологических тканях важное место занимает ОКТ. ОКТ представляет собой неинвазивный метод визуализации внутренней структуры оптически неоднородных объектов, основанный на принципах низкокогерентной интерферометрии, использующей свет ближнего ИК-диапазона (0.75–1.3 мкм) [31]. Метод позволяет изучать внутреннюю микроструктуру биотканей на глубину до 3 мм с пространственным разрешением 5–20 мкм без нарушения целостности биотканей [22]. В ряде работ [16, 32, 33] было показано, что ОКТ позволяет проводить мониторинг транспорта металлических наночастиц, введенных в биоткань, поскольку они увеличивают контраст ОКТ-изображения областей локализации этих наночастиц в биоткани.

Помимо визуализации оптических неоднородностей в биоткани, ОКТ позволяет измерять оптические параметры биотканей, такие, как показатель преломления, коэффициенты рассеяния и ослабления и фактор анизотропии рассеяния [23, 24, 34]. Количественная оценка изменений оптических параметров биоткани, вызванных присутствием в ней наночастиц, может дать дополнительную информацию о состоянии биоткани, например, для диагностических целей. Очевидно, однако, что при исследовании проникновения ЗНЧ в кожу методом ОКТ необходимо соответствие длины волны зондирующего излучения и максимума плазмонного резонанса наночастиц [32]. Среди всего многообразия наночастиц с настраиваемым плазмонным резонансом золотые наноболочки имеют ряд преимуществ (по сравнению, например, с золотыми наностержнями) благодаря низкой токсичности и высоким коэффициентам поглощения и рассеяния частицы в ИК-области окна прозрачности биотканей. Широкая полоса экстинкции, характерная для наноболочек (рис. 1а), позволяет использовать их для повышения контраста ОКТ-изображений даже если нет точного совпадения длины волны зондирующего излучения и максимума плазмонного резо-



**РИСУНОК 6** | Микрофотографии гистологических срезов кожи крысы с аллергическим контактным дерматитом после двукратного последовательного нанесения суспензии золотых наночастиц и низкочастотного УЗ-воздействия в течение 2 мин: (а) – окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 160$ ; (б) – окраска азотнокислым серебром с докраской толуидиновым синим, увеличение  $\times 160$ ; (в) – окраска азотнокислым серебром, увеличение  $\times 600$ . Цифрой 1 и стрелками обозначены скопления наночастиц золота



**РИСУНОК 7** | Микрофотографии гистологических срезов интактной кожи крысы после двукратного последовательного нанесения суспензии золотых наночастиц и низкочастотного УЗ-воздействия в течение 2 мин: (а) – окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 160$ ; (б) – окраска азотнокислым серебром, увеличение  $\times 1000$ . Цифрами и стрелками обозначены скопления наночастиц золота

нанса. В данном случае в спектральном диапазоне источника излучения томографа, составляющем  $\sim 930 \pm 50$  нм, оптическая плотность суспензии наноболочек снижалась в среднем всего на  $\sim 20\%$ . Таким образом, сохранялась возможность визуализации наночастиц в коже и оценки ее оптических параметров.

В данном исследовании совместное использование ОКТ и гистохимического анализа позволило выявить особенности проявления АКД на ОКТ-изображениях и распределение ЗНЧ в интактной и пораженной коже при различных способах усиления ее проницаемости.

Как известно, в основе АКД лежит разновидность гиперчувствительности замедленного типа, проявляющаяся в возникновении очагов воспаления на иммунной основе с вовлечением микроциркуляторного русла и сложных морфологических тканевых и клеточных процессов, развивающихся в зоне поражения [35]. В патоморфологический процесс при АКД вовлекаются эпидермис и дерма, претерпевающие деструктивные изменения.

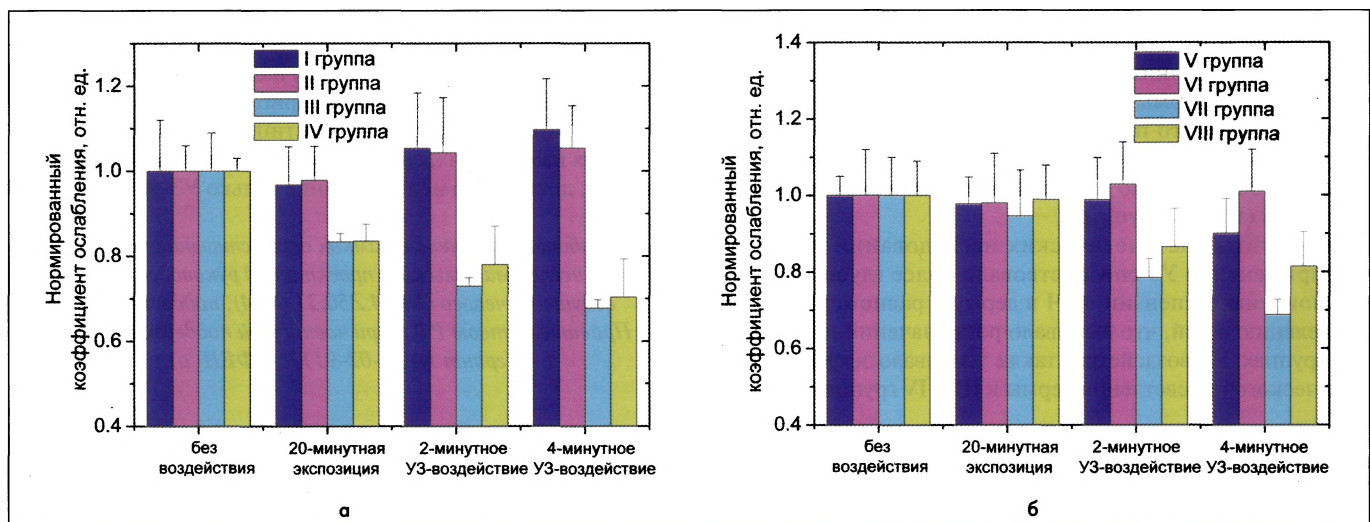
При макроскопическом изучении кожи животных с АКД были выявлены: стойкая гиперемия, шелушение, эксфолиация, серозные корки. В патоморфологической картине АКД наблюдались зоны выраженной деструкции всех слоев эпидермиса, часто встречались участки его десквамации с обнаженной раневой поверхностью, что можно было наблюдать на ОКТ-изображениях кожи (см. рис. 3б и в). Микроскопические морфологические изменения включали также акантоз (эпидермальную гиперплазию) – увеличение толщины шиповатого слоя эпидермиса с удлинением межсосочковых отростков. Результаты отдельных исследований показали, что при АКД изменяется синтез межклеточных липидов рогового слоя, следствием чего является, в первую очередь, нарушение барьерных свойств кожи [36].

В связи с выраженными расстройствами в микроциркуляторном русле, сопровождающимися нарушениями проницаемости стенок сосудов для дермы характерны отеки, резкие дистрофические изменения коллагеновых волокон, проявляющиеся в виде мукоидного набухания. На ОКТ-изображениях эти явления проявлялись в виде более однородной структуры дермы по сравнению с интактной кожей (см. рис. 3а).

Оптические параметры кожи с АКД и без патологии также несколько различались. Средние значения коэффициента ослабления верхних слоев дермы в пределах оптической глубины  $110 \pm 10$  мкм, полученные в результате расчета в соответствии с используемой моделью, составили для оголенной дермы (кожа с модельным АКД) приблизительно  $92 \pm 1$  см<sup>-1</sup>, а для интактной кожи  $97 \pm 3$  см<sup>-1</sup>. В целом значения коэффициента ослабления верхних слоев дермы для интактной кожи хорошо согласуются с данными, полученными с помощью спектродиффузии [25].

Ультразвук в качестве физического метода усиления диффузии применяется достаточно широко. В ряде работ было показано, что кратковременная акустическая кавитация, тепловой и механический эффекты, возникающие в приповерхностных слоях кожи под действием УЗ, улучшают трансдермальный транспорт различных лекарственных препаратов и химических агентов [37, 38], а также микро- и наночастиц [14, 15, 33].

Сравнительный анализ физического (ультразвук), химического (ДМСО), а также мультимодального физико-химического методов усиления диффузии суспензии наночастиц



**РИСУНОК 8** | Нормированные значения коэффициента ослабления дермы в группах экспериментальных животных с аллергическим контактным дерматитом (а) и интактной кожей (б), подвергнутых различным способам внедрения суспензии золотых наночастиц и основы суспензии

в иммерсионном растворе и отдельно иммерсионного раствора в коже, лишенной защитного эпидермального барьера и при наличии этого барьера, может оказаться полезным для развития данных методов.

*Рис. 8* демонстрирует нормированные значения коэффициента ослабления в дерме кожи с поврежденным эпидермальным слоем и здоровой кожи при различных способах внедрения суспензии ЗНЧ или иммерсионного раствора, являющегося основой суспензии.

На рисунке хорошо видно, что 20-минутная экспозиция исследуемого агента на поверхности кожи заметно снижала коэффициент ослабления дермы кожи только в III и VII группах. УЗ-воздействие в различных группах вызвало противоположные изменения оптических параметров дермы. Так в I группе наблюдалось увеличение значения  $\mu_d$  при последовательном однократном и двукратном нанесении суспензии ЗНЧ и УЗ-воздействии на дерму, во II и VI группах значение  $\mu_d$  несколько увеличивалось при однократном УЗ-воздействии и практически не изменялось при дополнительном введении исследуемой суспензии в дерму. В остальных группах коэффициент ослабления уменьшался с разной степенью эффективности относительно своего начального значения.

Данные различия в динамике изменения  $\mu_d$  связаны с присутствием в исследуемых агентах ЗНЧ. Так, во всех группах животных, в которых использовалась основа суспензии без ЗНЧ, наблюдалось заметное уменьшение коэффициента ослабления по сравнению с первоначальными значениями (см. *таблицу*), что связано с иммерсией кожи при ее взаимодействии с основой используемой суспензии. Поскольку показатель преломления исследуемого раствора близок к показателю преломления гидратированных коллагеновых и эластиновых волокон кожи ( $n = 1.411$ ) [39], то, проникая в глубь дермы и замещая собой внутритканевую жидкость ( $n = 1.345$ ) [26], он выравнивал показатели преломления основных компонентов биоткани, что приводило к ее оптическому просветлению [40]. Таким образом, уменьшение рассеяния верхних слоев кожи способствовало снижению коэффициента ослабления и соответственно более глубокому проникновению зондирующего излучения.

Наблюдаемое после 20-минутной экспозиции в I и II группах незначительное, в пределах погрешности, уменьшение параметра  $\mu_d$  связано, по-видимому, со скоплением ЗНЧ на поверхности дермы, а также проникновением основы суспензии в ткань дермы по волосяным фолликулам. Вследствие этого одновременно происходило два процесса: увеличение рассеяния за счет проникновения ЗНЧ в поверхностные слои дермы и снижение рассеяния дермы за счет ее иммерсионного просветления основой суспензии. Это предположение подтверждается тем, что в отсутствие ЗНЧ наблюдалось довольно эффективное оптическое просветление ткани (III и IV группы).

Результаты гистологических исследований показали, что применение УЗ способствовало более глубокому проникновению суспензии ЗНЧ в дерму и равномерному распределению в ней, что вызывало рост значений  $\mu_d$  дермы в I и II группах. УЗ-воздействие также усиливало эффективность оптического просветления дермы в III и IV группах.

В отличие от кожи с поврежденным РСЭ, интактная кожа продемонстрировала уменьшение коэффициента ослабления во всех группах, кроме шестой. В VI группе изменения  $\mu_d$  составляли всего 1–3 %. По-видимому, это связано с наличием РСЭ, который в интактной коже препятствовал проникновению ЗНЧ в дерму. Проникновение частиц в этом случае могло происходить только по волосяным фолликулам и протокам желез. С этим связано различное поведение коэффициента ослабления в V и VI группах. При этом, как следует из анализа гистологических срезов, концентрация наночастиц внутри эпидермиса и дермы при интактной коже оставалась незначительной. Это говорит о том, РСЭ служил фильтром для наночастиц. Вследствие этого происходило разделение компонентов суспензии: на поверхности кожи образовывался плотный слой ЗНЧ, а иммерсионный раствор диффундировал в дерму. При этом в V группе диффузия происходила более эффективно, чем в VI, поскольку в состав суспензии входил ДМСО.

При сравнении групп с аналогичными физическими воздействиями, но различающихся присутствием в составе суспензии ЗНЧ или иммерсионного раствора ДМСО видно, что использование ДМСО в качестве усилителя диффузии не оказывало существенного влияния на проницаемость кожи, лишенной РСЭ, для наночастиц. Однако при комбинированном физико-химическом воздействии на кожу степень ее оптического просветления была выше, чем при воздействии отдельно химического или физического усилителя транспорта иммерсионного агента. Кроме того, степень оптического просветления дермы в интактной коже приблизительно совпадала со степенью просветления дермы при отсутствии РСЭ, что свидетельствует об эффективном преодолении эпидермального барьера кожи за счет использования мультимодального подхода.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты исследований и сравнительный анализ комбинированного и отдельного влияния ультразвука и ДМСО на транспорт суспензии наночастиц в иммерсионном растворе и отдельно иммерсионного раствора в коже, лишенной защитного эпидермального барьера и при наличии этого барьера, на основе данных оптической когерентной томографии и гистохимического анализа. Показано, что оптимальным методом усиления трансдермального транспорта иммерсионного раствора является мультимодальное физико-химическое воздействие (комбинация ДМСО и ультразвука), причем эффективность оптического просветления дермы как при наличии, так и при отсутствии рогового слоя эпидермиса приблизительно одинакова. Для усиления транспорта наночастиц в кожу при ее патологических изменениях, связанных с повреждением защитного барьера, достаточно использование только УЗ-воздействия.

*Работа выполнена в рамках осуществления научно-исследовательского проекта под руководством ведущего ученого (№ 14.Z50.31.0004), поддержанного Правительством РФ и при частичной поддержке РФФИ (грант № 13-02-91176-ГФЕН\_а).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boisselier E., Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 6. P. 1759.
2. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 2010. V. 111. № 1. P. 1.
3. Labouta H.I., Schneider M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2013. V. 9. № 1. P. 39.
4. Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López-Quintela M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin // *J. Invest. Dermatol.* 2007. № 7. V. 127. P. 1701.



5. Cevc G., Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal // *J. Control. Release*. 2010. V. 141. № 3. P. 277.
6. Filon F.L., Crosera M., Adami G., Bovenzi M., Rossi F., Maina G. Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin // *Nanotoxicology*. 2011. V. 5. № 4. P. 493.
7. Labouta H.I., Liu D.C., Lin L.L., Butler M.K., Grice J.E., Raphael A.P., Kraus T., El-Khordagui L.K., Soyer H.P., Roberts M.S., Schneider M., Prow T.W. Gold nanoparticle penetration and reduced metabolism in human skin by toluene // *Pharm. Res.* 2011. V. 28. № 8. P. 2931.
8. Trommer H., Neubert R.H.H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration // *Skin Pharmacol. Physiol.* 2006. V. 19. № 2. P. 106.
9. Zafar S., Ali A., Aqil M., Ahad A. Transdermal drug delivery of labetalol hydrochloride: feasibility and effect of penetration enhancers // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2010. V. 2. № 4. P. 321.
10. Mortensen L.J., Oberdorster G., Pentland A.P., Delouise L.A. In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR // *Nano Lett.* 2008. V. 8. № 9. P. 2779.
11. Upadhyay P. Enhanced transdermal-immunization with diphtheriatoxoid using local hyperthermia // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 27–28. P. 5593.
12. Chen H.-Y., Zhao Q., Su K.-L., Lin Y.-C. Development of transdermal delivery chip system: deliver gold nanoparticles into human stratum corneum. 3rd IEEE International Conference on Nano-Micro Engineered and Molecular System. NEMS 2008. Hainan Island, China. 6–9 January 2008. <http://ieeexplore.ieee.org/xpl/articleDetails.jsp?arnumber=4484489>.
13. Krishnan G., Edwards J., Chen Y., Benson H.A. Enhanced skin permeation of naltrexone by pulsed electromagnetic fields in human skin in vitro // *J. Pharm. Sci.* 2010. V. 99. № 6. P. 2724.
14. Lee S.E., Choi K.J., Menon G.K., Kim H.J., Choi E.H., Ahn S.K., Lee S.H. Penetration pathways induced by low-frequency sonophoresis with physical and chemical enhancers: iron oxide nanoparticles versus Lanthanum Nitrate // *J. Invest. Dermatol.* 2010. V. 130. № 4. P. 1063.
15. Терентюк Г.С., Генина Э.А., Башкатов А.Н., Рыжова М.В., Цыганова Н.А., Чумаков Д.С., Хлебцов Б.Н., Сазонов А.А., Долотов Л.Е., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г., Иноземцева О.А. Использование фракционной лазерной микроабляции и ультразвука для улучшения доставки наночастиц золота в кожу in vivo // *Квантовая электроника*. 2012. Т. 42. № 6. С. 471.
16. Khayrullin R.M., Terentyuk G.S., Savenkova M.V., Genina E.A. The technique of enhancing the transdermal penetration for the gold nanoparticles and perspectives of application // *J. Cancer Therapy*. 2013. V. 4. № 6A1. P. 48.
17. Lee O., Jeong S.H., Shin W.U., Lee G., Oh C., Son S.W. Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration // *Skin Research and Technology*. 2013. V. 19. № 1. P. e390.
18. Larina I.V., Evers B.M., Ashitkov T.V., Bartels C., Larin K.V., Esenaliev R.O. Enhancement of drug delivery in tumors by using interaction of nanoparticles with ultrasound radiation // *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2005. V. 4. № 2. P. 217.
19. Khanadeev V.A., Khlebtsov B.N., Staroverov S.A., Vidyasheva I.V., Skaptsov A.A., Ileneva E.S., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Quantitative cell bioimaging using gold-nanoshell conjugates and phage antibodies // *J. Biophotonics*. 2011. V. 4. № 2. P. 74.
20. Залкан П.М., Иевлева Е.А. Экспериментальная модель аллергического дерматита. Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. М.: Медицина, 1965.
21. Sourcebook of models for biomedical research // Ed. P. Michael Conn. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2008.
22. Wang R.K., Tuchin V.V. Optical Coherence Tomography. Light Scattering and Imaging Enhancement. Chap. 16 in *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods. Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring, and Material Science*, 2<sup>nd</sup> ed. // Ed. V.V. Tuchin. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2013. V. 2. P. 665.
23. Faber D.J., van der Meer F.J., Aalders M.C.G., van Leeuwen T.G. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography // *Optics Express*. 2004. V. 12. № 19. P. 4353.
24. Lee P., Gao W., Zhang X. Performance of single-scattering model versus multiple-scattering model in the determination of optical properties of biological tissue with optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 2010. V. 49. № 18. P. 3538.
25. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования ex vivo и in vivo // *Оптика и спектроскопия*. 2010. Т. 109. № 2. С. 1312.
26. Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. М.: Физматлит, 2012.
27. Genina E.A., Bashkatov A.N., Kolesnikova E.A., Vasco M.V., Terentyuk G.S., Tuchin V.V. Optical coherence tomography monitoring of enhanced skin optical clearing in rats in vivo // *J. Biomed. Opt.* 2014. V. 19. № 2. P. 021109.
28. Директива № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза «О защите животных, использующихся для научных целей». <http://pravo-zoozahita.ru/soviet-evropejskogo-soyuza-o-blagopoluchii-zhivotnyh-ispolzuyushhixsya-dlya-nauchnyh-celej/>.
29. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Утв. Главным государственным санитарным врачом СССР (06.04.1973 № 1045-73). <http://zakon.law7.ru/base77/part1/d77ru1735.htm>.
30. Hacker G.W., Danscher G. Recent advances in immunogold-silver staining – autometallography // *Cell Vision*. 1994. V. 1. № 2. P. 102.
31. Optical Coherence Tomography: Technology and Applications // Eds W. Drexler, J.G. Fujimoto. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
32. Kirillin M., Shirmanova M., Sirotkina M., Bugrova M., Khlebtsov B., Zagaunova E. Contrasting properties of gold nanoshells and titanium dioxide nanoparticles for optical coherence tomography imaging of skin: Monte Carlo simulations and in vivo study // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. № 2. P. 021017.
33. Генина Э.А., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Башкатов А.Н., Тучин В.В. Визуализация распределения наночастиц золота в тканях печени ex vivo и in vitro методом оптической когерентной томографии // *Квантовая электроника*. 2012. Т. 42. № 6. С. 478.
34. Kodach V.M., Faber D.J., van Marle J., van Leeuwen T.G., Kalkman J. Determination of the scattering anisotropy with optical coherence tomography // *Optics Express*. 2011. V. 19. № 7. P. 6131.
35. Серов В.В. // *Общая патология человека* / Под ред. А.И. Струкова, В.В. Серова, Д.С. Саркисова. М.: Медицина, 1982. С. 13.
36. Ломакина Е.А. Роль барьерной функции кожи в патогенезе некоторых дерматозов // *Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии*. 2009. Т. 2. № 2. С. 87.
37. Lavon I., Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery // *Drug Discovery Today*. 2004. V. 9. № 15. P. 670.
38. Zhong H., Guo Z., Wei H., Zeng C., Xiong H., He Y., Liu S. In vitro study of ultrasound and different-concentration glycerol-induced changes in human skin optical attenuation assessed with optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2010. V. 15. № 3. P. 036012.
39. Wang X., Milner T.E., Chang M.C., Nelson J.S. Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. № 2. P. 212.
40. Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood*. PM154, Bellingham: SPIE Press, 2006.