

Использование фракционной лазерной микроабляции и ультразвука для улучшения доставки наночастиц золота в кожу *in vivo*

Г.С.Терентюк, Э.А.Генина, А.Н.Башкатов, М.В.Рыжова, Н.А.Цыганова, Д.С.Чумаков, Б.Н.Хлебцов, А.А.Сазонов, Л.Е.Долотов, В.В.Тучин, Н.Г.Хлебцов, О.А.Иноземцева

В эксперименте in vivo исследована доставка диспергированных в растворе (глицерин + полиэтиленгликоль-400, 1:1) наночастиц золота, представляющих собой покрытые слоем диоксида кремния (40/20 нм) наноклетки, в ткань кожи. Из данных оптической когерентной томографии и гистохимического анализа следует, что простое нанесение суспензии наночастиц недостаточно эффективно для доставки частиц в кожу в результате пассивной диффузии. Показано, что фракционная лазерная микроабляция кожи перед нанесением суспензии и последующая обработка участков ультразвуком позволяют преодолеть слой эпидермиса и доставить наночастицы в дерму и гиподерму.

Ключевые слова: золотые наноклетки с оболочкой из диоксида кремния, доставка наночастиц в кожу, фракционная лазерная микроабляция, оптическая когерентная томография.

1. Введение

Кожа обеспечивает первичную физическую и иммунную защиту организма от внешних воздействий, токсических веществ, патогенных микроорганизмов и т. д. [1] за счет наличия в ней различных молекулярно-клеточных защитных систем, например лизирующих ферментов, дендритных клеток и макрофагов [2, 3]. В то же время большая поверхность и доступность различным воздействиям позволяют использовать кожу для местно-региональной и трансдермальной доставки терапевтических агентов в

кровеносную систему [4–6]. В некоторых аспектах (меньшая травматичность, снижение побочных эффектов, контролируемая пролонгируемость и т. п.) трансдермальный способ имеет преимущества перед оральным или внутривенным введением [6, 7], несмотря на то что проникновение гидрофильных субстанций в кожу через липофильный поверхностный слой затруднено [8].

Развитие нанобиотехнологии привело к существенному расширению области биомедицинских применений наноразмерных материалов [8, 9]. Это, в частности, дерматология, косметология и использование наночастиц в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов [10–12], в том числе внутрь кожи или через неё [13]. Развитие последнего направления требует понимания механизмов взаимодействия наночастиц с кожей, которая представляет собой структурно сложную биоткань, состоящую из эпидермиса, дермы и гиподермы [14]. В эпидермисе, в свою очередь, выделяют пять слоев: базальный, шиповатый, зернистый, блестящий и роговой, который является основной преградой для проникновения наночастиц внутрь кожи [14, 15]. Возможные пути миграции вещества через роговой слой определяют три способа проникновения наночастиц: через липидный матрикс, через мембраны кератиноцитов и через сальные и потовые железы [6], причем последний способ может быть наиболее эффективным [16].

Эффективность проникновения наночастиц в кожу зависит от многих факторов, которые также можно условно разделить на три группы. Первая группа – это свойства самой кожи, включая её толщину [17], плотность расположения придатков [18], степень гидратации рогового слоя [19], скорость кровотока [20], наличие каких-либо патологий [21], характер метаболизма [22] и т. д. Ко второй группе относятся размер наночастиц [23] (и, вероятно, их форма), заряд [24], поверхностная функционализация [25], свойства растворителя [26] или геля [27], в котором диспергированы частицы. Третья группа факторов – это внешние физико-химические воздействия, способствующие улучшению проницаемости кожи для наноча-

Г.С.Терентюк. Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Ульяновский государственный университет, Россия, 432000 Ульяновск, ул. Л.Толстого, 42; Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского, Россия, 410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 112; e-mail: vetklinika@front.ru

Э.А.Генина, А. Н. Башкатов, Д.С.Чумаков, Л.Е.Долотов, О.А.Иноземцева. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Научно-образовательный институт оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: eagenina@yandex.ru

М.В.Рыжова, Н.А.Цыганова. Ульяновский государственный университет, Россия, 432000 Ульяновск, ул. Л.Толстого, 42; e-mail: Reallady25@mail.ru

Б.Н.Хлебцов. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

А.А.Сазонов. Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского, Россия, 410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 112

В.В.Тучин. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Научно-образовательный институт оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; University of Oulu P.O. Box 4500, Oulu, FIN-90014, Finland; e-mail: tuchinvv@mail.ru

Н.Г.Хлебцов. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

стиц [28]. К таким воздействиям относятся обработка ультразвуком [29], использование методики поверхностно-эпидермальных отрывов [30], применение для перфорации кожи микроигл [31], фотомеханическое воздействие [32], фракционная лазерная микроабляция [33], ионофорез [34], облучение ультрафиолетом [35], применение химических усилителей проницаемости на основе растворителей липидных мостиков рогового слоя (диметилсульфоксид (ДМСО) и многие другие) [36, 37] и т. д.

Широкий спектр наночастиц, используемых для местно-региональной доставки, включает липосомы [38], липидные наноструктуры [39], полимерные наночастицы [40], наночастицы на основе диоксида титана и оксида цинка [41], магнитные наночастицы [42], а также наночастицы серебра [43] и золота [23, 27, 44]. В частности наночастицы золота, благодаря уникальным оптическим свойствам [45], низкой токсичности [46] и возможности функционализации различными молекулярными векторами [47], активно используются в биомедицине [48], включая новое направление – тераностику, сочетающую терапевтические и диагностические возможности в одной наноконструкции [49, 50].

Несмотря на большое разнообразие наночастиц золота, используемых в настоящее время [9, 48], число работ по исследованию их возможностей для местно-региональной и трансдермальной доставки крайне ограничено. Сонаване и др. [23] исследовали проникновение золотых наносфер диаметром 15, 102 и 198 нм в кожу крысы *in vitro*. Было показано, что частицы диаметром 15 нм обнаруживались как в эпидермальном, так и в дермальном слоях кожи, тогда как проникновение более крупных частиц было минимальным. В работе [44] сравнивалось проникновение золотых наносфер в интактную и механически поврежденную кожу человека *in vitro*. Нарушение структуры кожного покрова в целом увеличивало концентрацию наночастиц внутри слоев кожи. Использование толуола в качестве дисперсионной среды для частиц коллоидного золота диаметром 15 нм [26] также увеличивало концентрацию наночастиц в интактной коже, в особенности в шиповатом слое эпидермиса.

Несмотря на большой интерес и множество публикаций, эффективная доставка гидрофильных субстанций через кожу остается нерешенной задачей. Пытаясь решить эту проблему, группы Гото [51] и Ниидоме [52] предложили использовать нанодисперсии типа *solid-in-oil* на основе гидрофобных поверхностно-активных веществ (ПАВ). Было показано, что подобные наночастицы с включенным инсулином имеют размер ~ 250 нм и обеспечивают доставку препарата в кожу почти на порядок эффективнее, чем водный раствор инсулина. В работе [52] исследовалось проникновение нанодисперсий на основе ПАВ L195, овальбумина и покрытых *m*-PEG золотых наностержней и было показано, что фототермический нагрев последних приводит к увеличению эффективности доставки белка через кожу.

Цитируемые работы выявили принципиальную возможность местно-региональной доставки наночастиц золота в кожу. Однако эти данные были получены только в экспериментах *in vitro*, тогда как свойства интактной кожи животного заведомо отличаются от свойств образцов в модельных экспериментах. Кроме того, и это самое главное, без применения дополнительного воздействия пассивная доставка частиц в кожу или через неё малоэффективна для наночастиц даже малых размеров (15–20 нм),

не говоря уже о более крупных. Таким образом, актуальной является задача повышения эффективности доставки наночастиц золота в широком диапазоне их размеров (от 15 до 200 нм) с использованием различных видов физико-химических воздействий. В частности, перспективным представляется метод фракционной лазерной микроабляции в комбинации с ультразвуковым воздействием, предложенный в [33].

Целью настоящей работы является исследование возможности доставки золотых наноклеток с оболочкой из оксида кремния в ткани кожи *in vivo* с использованием мультимодального подхода – фракционной лазерной микроабляции, ультразвукового воздействия и специальной композиции для диспергирования наночастиц.

2. Материалы и методы

2.1. Синтез и характеристика золотых наночастиц и композиции с наночастицами

Для синтеза золотых наноклеток использовались следующие реактивы: нитрат серебра AgNO_3 (более 99.9%, Aldrich, США), этиленгликоль (99%, Aldrich, США), поливинилпирролидон ($M_w = 55000$, Sigma-Aldrich, США), изопропиловый спирт (ЧДА, «Вектон», РФ), тетраэтилортосиликат (98%, Aldrich, США), 30%-ный водный раствор аммиака (Aldrich, США), ацетон (ЧДА, «Вектон», РФ), этанол абсолютный (99.99%, 64-17-5 Sharlau, Испания), сульфид натрия наонагидрат $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (ОСЧ, ГОСТ 2053-77, РФ), аргон сжиженный (99.99%), деионизированная вода MilliQ (18 МОм.см, Millipore, США).

Стеклопосуда перед использованием была обработана смесью азотной и хлористоводородной кислот ($\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$) с последующей промывкой раствором КОН в изопропиловом спирте и окончательно деионизированной водой.

Золотые наноклетки получали с использованием двухстадийного протокола [53]. Кратко: 30 мл этиленгликоля нагревали до 150°C в течение 50 мин. Добавляли последовательно при протокке аргона 0.35 мл раствора сульфида натрия (0.3 мМ) в этиленгликоле, 7.5 мл раствора поливинилпирролидона в этиленгликоле с концентрацией 20 мг/мл, 2.5 мл раствора нитрата серебра в этиленгликоле с концентрацией 48 мг/мл. Частицы центрифугировали (с ускорением 10000g) 30 мин и перерастворяли в 40 мл этанола. На магнитной мешалке к 100 мл раствора поливинилпирролидона (1 мг/мл) добавляли 2 мл серебряных кубиков и нагревали смесь до 100°C . Далее дробно, по 100 мкл, добавляли 10 мл золотохлористоводородной кислоты (1 мМ). Цвет суспензии изменялся от желтого до синего, при этом плазмонный резонанс экстинкции смешался до 770 нм. Полученную суспензию охлаждали и добавляя в нее 0.7 мл 30%-ного аммиака. Затем частицы три раза центрифугировали (10000g) по 30 мин и перерастворяли в воде. В конце отмывки частицы смешивали с водой до достижения оптической плотности 25 на длине волны 770 нм.

Покрытые оксидом кремния наночастицы получали по модифицированному методу Стебера [54]. К 4 мл суспензии наноклеток в воде добавляли 18 мл изопропилового спирта. На мешалке при комнатной температуре добавляли 0.5 мл аммиака и 25 мкл тетраэтилортосиликата. Время реакции составляло 50 мин. Далее частицы пять

раз центрифугировали (5000g) по 10 мин и перерастворяли в воде. В конце отмывки частицы смешивались с водой до достижения оптической плотности 25 на длине волны 790 нм.

Геометрические параметры наночастиц определяли по трансмиссионным электронно-микроскопическим (ТЭМ) изображениям, полученным на электронном микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Германия), а их оптические свойства контролировали по спектрам экстинкции, измеренным на UV-VIS спектрофотометре Specord 250 (Analytic, Jena, Германия). Согласно данным ТЭМ, средний размер золотой наноклетки составлял 40 ± 4 нм, средняя толщина слоя двуокиси кремния была равна 20 ± 3 нм (рис.1,а), длина волны плазмонного резонанса до и после покрытия наночастиц слоем силиката соответственно составляла 770 и 790 нм (рис.1,б).

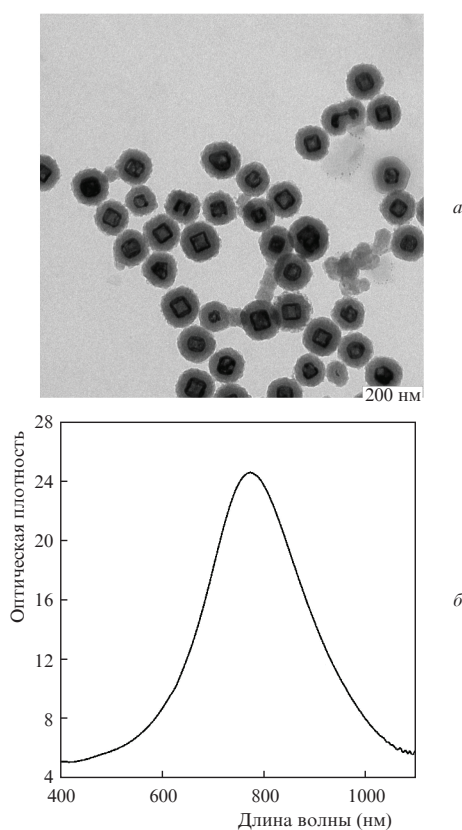


Рис.1. ТЭМ-изображение покрытых оксидом кремния золотых наноклеток (а) и их спектр экстинкции (б). Оптическая плотность в спектрах получена путем аппроксимации данных с учетом разведения и измерения в кювете с оптическим путем 1 мм.

Приготовление суспензии коллоида золотых наноклеток, покрытых слоем диоксида кремния, 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, $M_w = 400$, Aldrich, США) ($n = 1.463$) в равных соотношениях. Общий объем раствора составлял 920 мкл ($n_s = 1.465$). К полученному раствору по каплям добавляли концентрированные наночастицы (1 мл коллоида). 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.

2.2. Эксперимент

В работе использовались мужские особи белых аутбредных лабораторных крыс. К началу эксперимента их возраст составлял восемь недель, а масса тела была равна ~ 200 г. Организация работы соответствовала международным этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с законом о благополучии животных Конвенции Европейского Союза и Европейской Конвенции защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), в международных правилах Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies от 04.03.2002 г. и в приказе МЗ РФ № 267 от 19.06. 2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Для эксперимента было взято 10 крыс. Непосредственно перед экспериментом они были подвергнуты общей анестезии посредством внутримышечного введения препарата Zoletil 50 (Virbac, Франция).

Перед проведением измерений со спины животных с помощью крема-депилятора Nair (Church & Dwight Co., Inc., США) удалялись волосы, и на чистой коже выделялось семь участков размером $\sim 2 \times 1.5$ см. На экспериментальные участки была местно нанесена суспензия, содержащая наночастицы. В качестве контрольных использовались участок интактной кожи (участок 1) и участок с нанесенной суспензией наноклеток, покрытых слоем диоксида кремния (участок 2). Для усиления степени проникновения наночастиц в кожу были использованы фракционная лазерная микроабляция (ФЛМА) и ультразвуковое (УЗ) воздействие (ультрасонофорез). В табл.1 приведено описание всех семи участков кожи.

Табл.1. Описание контрольных и экспериментальных участков кожи. Основа суспензии – смесь 95%-ного водного раствора глицерина и ПЭГ-400 (1 : 1).

Номер участка	Серия	Методы воздействия на кожу
1	Контроль	Интактная кожа
2		Суспензия наночастиц, покрытых слоем диоксида кремния
3	Ультрасонофорез (УЗ)	Суспензия наночастиц, покрытых слоем диоксида кремния, + УЗ
4		Фракционная лазерная микроабляция
5	Фракционная лазерная микроабляция	Фракционная лазерная микроабляция + нанесение суспензии наночастиц, покрытых слоем диоксида кремния
6		Фракционная лазерная микроабляция + нанесение основы суспензии + УЗ
7	Фракционная лазерная микроабляция + УЗ	Фракционная лазерная микроабляция + нанесение суспензии наночастиц, покрытых слоем диоксида кремния, + УЗ

На участок 3 наносилась суспензия наночастиц, а затем он подвергался УЗ воздействию. Участки 4–7 подвергались ФЛМА непосредственно перед нанесением исследуемых агентов. Данная манипуляция осуществлялась при помощи эрбиевого лазера Palomar Lux2940 (Palomar Medical Products, США) со следующими параметрами: $\lambda = 2940$ нм, трехпиковый режим работы с общей энергией 3 Дж, энергия импульса 1 Дж, длительность – 5 мс. Для перфорации использовалась насадка, с помощью которой в коже на участке площадью 6×6 мм создавалось 169 вертикальных микроканалов в форме конусов. Расстояние между каналами составляло ~ 500 мкм, глубина канала была равна ~ 200 мкм, диаметр на поверхности равнялся ~ 100 мкм.

Для усиления проницаемости кожи и обеспечения более равномерного распределения в ней наночастиц участки 3, 6 и 7 подвергались ультразвунофорезу. Воздействие осуществлялось при помощи УЗ излучателя Dynatron 125 (Dynatronics, США) в течение 2 мин в непрерывном режиме с частотой 3 МГц при плотности мощности 1.5 Вт/см². Через 30 мин после экспозиции ультразвуком поверхность кожи обрабатывалась влажным тампоном для удаления с поверхности суспензии наночастиц.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) использовалась для качественной оценки накопления наночастиц в коже при разных типах воздействия. Визуализация проводилась с помощью оптического когерентного томографа Spectral Radar OCT System OCP930SR 022 (Thorlabs Inc., США) на длине волны 930 нм. Ширина спектральной полосы составляла 100 нм, выходная мощность – 2 мВт, оптическая глубина сканирования – 1.6 мм, разрешение системы по глубине было равно 6.2 мкм. Сканирование каждого участка осуществлялось двукратно: до различных манипуляций и воздействий и после внедрения исследуемых агентов и их удаления с поверхности исследуемых участков.

Для детектирования зон накопления наночастиц в коже при местном нанесении использовалось гистохимическое окрашивание срезов тканей азотнокислым серебром [55]. Депарафинированные срезы кожи помещали на 15 мин в 5%-ный раствор азотнокислого серебра в кипящей водяной бане и затем оставляли на 12–24 ч при 40 °С. Для удаления осадка серебра срезы переносили в 20%-ную азотную кислоту. Окрашенные срезы промывали водой, обезживляли и просветляли ксилолом. Сравнительно-морфологический анализ и морфометрия структур на постоянных микропрепаратах проводились с использованием бинокулярного микроскопа Motic В3 (Motic, КНР) при увеличениях $400\times$ и $600\times$.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.2 слева показаны ОКТ-изображения участков кожи контрольной серии (участки 1, 2, табл. 1) и участка, обработанного ультразвуком после нанесения суспензии наночастиц (участок 3, табл. 1), а справа – соответствующие усредненные профили ОКТ-сигнала. Усреднение проводилось по пяти А-сканам в центральной области томограммы. На изображениях участков интактной кожи (рис.2,а), кожи при пассивном нанесении суспензии с исследуемыми наночастицами (рис.2,б) и кожи с УЗ внедрением наночастиц (рис.2,в) заметен слой эпидермиса. Над поверхностью кожи выделяются изображения волос, создающих темные области в дерме кожи. На профилях ОКТ-сиг-

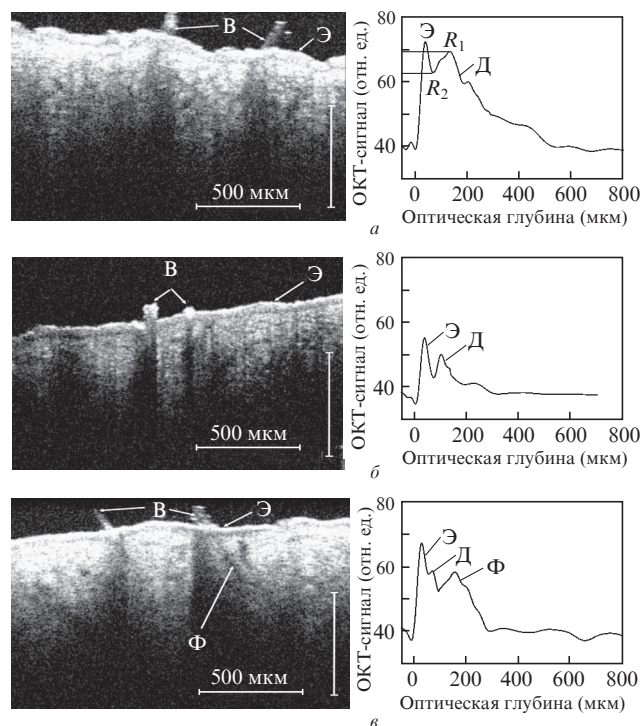


Рис.2. ОКТ-изображения (слева) и профили соответствующих ОКТ-сигналов (справа) интактной кожи (участок 1) (а), участка 2 с нанесенной суспензией, содержащей наночастицы (б) и участка 3, обработанного ультразвуком после нанесения суспензии (в). Буквами обозначены: эпидермис (Э), дерма (Д), волос (В) и фолликул (Ф).

нала эпидермис соответствует первому пику, область дермы, граничащая с эпидермисом, – второму пику, минимум между этими пиками – границе между эпидермисом и дермой.

Для оценки оптической глубины зондирования кожи использовалась величина, соответствующая снижению ОКТ-сигнала в e раз относительно уровня сигнала от поверхности кожи. Для интактной кожи эта глубина составляла 300–350 мкм, для участка 2 – порядка 200 мкм. Снижение оптической глубины зондирования может объясняться экранирующим эффектом наночастиц золота, располагающихся на поверхности кожи и в устье волосяных фолликулов, который возникает за счет как дополнительного поглощения света частицами по сравнению с окружающей биотканью [56], так и их высокой отражательной способности. Это приводит к тому, что ОКТ-сигнал и от эпидермиса и от ткани дермы значительно снижается. Из анализа профилей ОКТ-сигнала для различных участков следует, что это снижение составляет ~ 1.3 раза.

Использование ультразвука способствует проникновению суспензии наночастиц внутрь волосяных фолликулов. Подтверждением этого служит рис.2,в, на котором виден фолликул в толще слоя дермы. При этом оптическая глубина зондирования участка 3 (рис.2,в) и интактной кожи (участок 1, рис.2,а) практически совпадают. Однако при удалении суспензии наночастиц с поверхности кожи они остаются внутри волосяных фолликулов, и из рис.2,в видно, что оптическая глубина зондирования участка 3 в области фолликула значительно меньше (~ 250 мкм), чем соответствующего участка интактной кожи (рис.2,а).

На рис.3 слева представлены изображения участков 4–7 с комбинацией ФЛМА и различных воздействий (см. табл.1), а справа – усредненные профили ОКТ-сигнала. Хорошо видно, что перфорация кожи сама по себе не из-

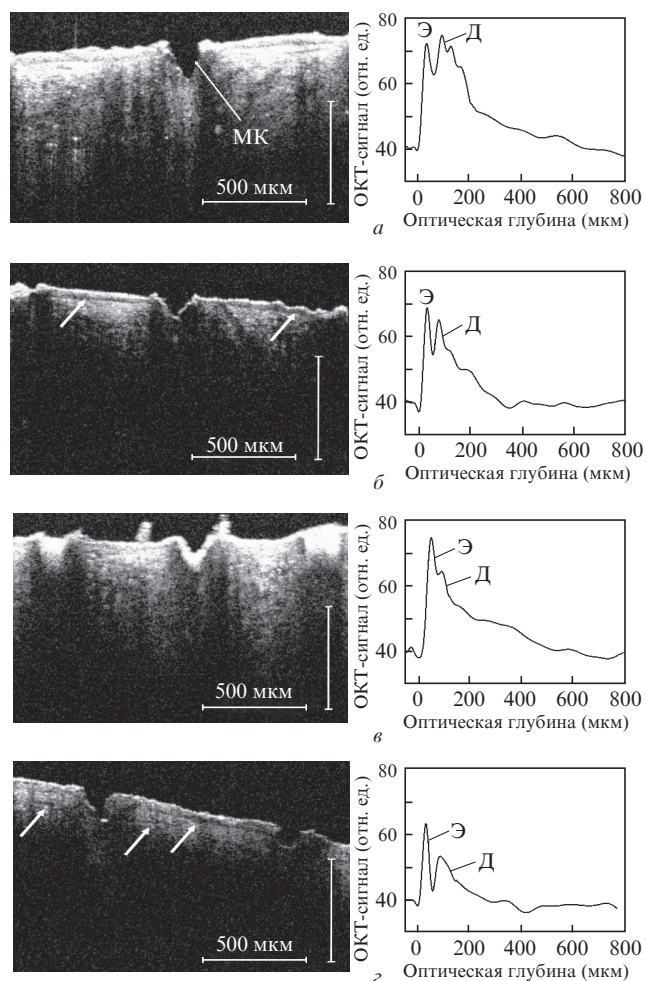


Рис.3. ОКТ-изображения (слева) и профили соответствующих ОКТ-сигналов (справа) участков кожи, подвергнутых фракционной лазерной микроабляции: без нанесения суспензии наночастиц и УЗ воздействия (участок 4) (а), после нанесения суспензии наночастиц (5) (б), после нанесения основы суспензии и УЗ обработки (6) (в), после нанесения суспензии наночастиц и УЗ обработки (7) (г); МК – микроканал.

меняла оптической глубины зондирования, которая в среднем составляла ~ 320 мкм, что близко к значению данного параметра для интактной кожи (см. рис.2,а). Нанесение на поверхность кожи суспензии исследуемых наночастиц способствовало значительному (в среднем до 150 мкм) снижению оптической глубины зондирования на участках между микроканалами и практически до нуля на участках самих микроканалов (рис.3,б).

Как следует из рис.3,в, при комбинированном воздействии ультразвука и основы суспензии оптическая глубина зондирования на участках между микроканалами оставалась равной ~ 320 мкм, а на участках под микроканалами также снижалась. Поскольку смесь глицерина и ПЭГ-400, служащая основой суспензии, способствует оптическому просветлению (снижению коэффициента рассеяния под действием гиперосмотических иммерсионных агентов [57]) кожи (показатель преломления раствора $n_s = 1.465$ превышает показатель преломления внутритканевой жидкости $n_{liq} = 1.345$ и близок к показателю преломления основных рассеивателей кожи – гидратированных коллагеновых и эластиновых волокон – $n_c = 1.41-1.42$ [58, 59]), ожидалось, что оптическая глубина зондирования может увеличиться. Однако заметного увеличения глуби-

ны проникновения света в биоткань не наблюдалось. По-видимому, это связано с относительно небольшим (~ 30 мин) временем воздействия иммерсионного агента (раствор глицерина и ПЭГ-400), что, по-видимому, недостаточно для иммерсирования верхних слоев кожи. Изображения микроканалов, заполненных основой суспензии, хорошо видны на рис.3,в (слева) как ярко-белые конусообразные участки.

На рис.3,г иллюстрируется результат мультимодального воздействия на кожу ФЛМА, суспензии наночастиц и ультразвука. В данном случае, аналогично участку 5, оптическая глубина зондирования уменьшилась в среднем до 120 мкм. По-видимому, это происходит за счет локального уплотнения наночастиц на поверхности кожи, в ее роговом слое и в приповерхностных слоях живого эпидермиса на участках между каналами, а также вследствие распределения наночастиц в дерме в области каналов под действием ультразвука, т.е. в результате создания более плотного отражающего экрана, чем при пассивном нанесении суспензии наночастиц на поверхность кожи, препятствующего проникновению зондирующего излучения в более глубоко лежащие слои кожи. В то же время при комбинированном воздействии ФЛМА, наночастиц и ультразвука на томограмме отчетливо проявляется структура кожи, ее отдельные слои.

Анализируя изображения, полученные от участков 2, 3, 5 и 7 (рис.2,б, в и 3,б, г), можно заметить, что снижение интенсивности ОКТ-сигнала, вызванное нанесением на поверхность или внедрением в глубь кожи суспензии наночастиц, способствует увеличению контраста визуализации эпидермиса и структурных неоднородностей, находящихся под поверхностью кожи (отмечены стрелками на рис.3,б, г, слева). Полученные профили ОКТ-сигнала (рис.2 и 3, справа) позволяют оценить контраст изображения эпидермиса относительно изображения дермы как отношение разности значений ОКТ-сигнала от дермы на границе с эпидермисом R_1 и от границы между дермой и эпидермисом R_2 к их сумме: $(R_1 - R_2)/(R_1 + R_2)$ (см. рис.2,а, справа). Средний контраст изображений интактной (рис.2,а) и перфорированной (рис.3,а) кожи составляет 0.06 ± 0.01 , участка кожи с введенной основой суспензии (рис.3,в) – 0.01 ± 0.004 , участков с внедренной суспензией наночастиц (рис.2,б, в и 3,б, г; на рис.2,в рассматривалась область над фолликулом) – 0.08 ± 0.01 . Таким образом, среднее значение контраста изображения эпидермиса в результате введения суспензии исследуемых наночастиц увеличилось в 1.3 раза. В то же время из сравнения рис.3,б и г видно, что, несмотря на одинаковое значение контраста на границе эпидермис–дерма, структура кожной ткани существенно лучше визуализируется в случае применения дополнительно к внедрению наночастиц и ФЛМА ультразвукового воздействия.

Данные ОКТ о локализации наночастиц на поверхности и внутри дермы при различных способах их введения в кожу подтверждаются данными гистологического анализа (рис.4). Окрашивание препаратов, полученных в результате биопсии всех участков кожи, азотнокислым серебром позволяет качественно оценивать степень проникновения наночастиц в слои кожного покрова и их локализацию. В случае пассивного нанесения суспензии на кожу характер окрашивания был практически идентичен таковому для препарата интактной кожи (участок 1, рис.4,а). На рис.4,б представлена фотография гистологического препарата участка 3, на который наносилась су-

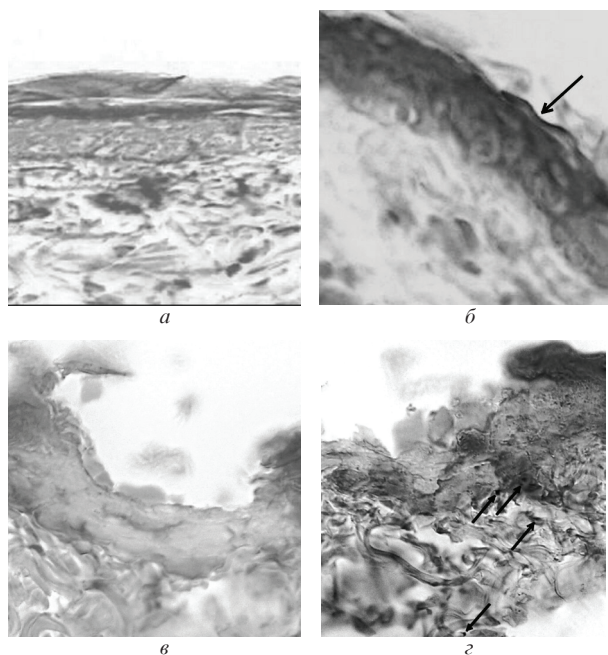


Рис.4. Фотографии гистологических препаратов: интактной кожи (участок 1) (а); участка после нанесения суспензии наночастиц и УЗ обработки (3) (б), участков после нанесения основы суспензии и УЗ обработки (6) (в) и после нанесения суспензии наночастиц и УЗ обработки (7) (г). Изображения получены при увеличении $400\times$ (а) и $600\times$ (б–г). Темные пятна соответствуют кластерам частиц (отмечены стрелками).

спензия наночастиц в комбинации с УЗ воздействием. Незначительная по размерам зона накопления наночастиц видна в роговом слое (отмечена стрелкой). При этом сколько-нибудь значительного проникновения наночастиц в глубь кожного покрова не происходит. Таким образом, ультразвукофорез сам по себе не приводит к эффективному проникновению наночастиц через роговой слой кожи.

На рис.4,в представлена фотография гистологического препарата участка 6 (см. табл.1). Хорошо видна зона абляции, окруженная слоем коагулированной ткани.

На рис.4,г также представлена зона абляции, однако, в отличие от рис.4,в, слой коагулированной ткани в данном случае не выражен. Причина может заключаться в следующем: частицы под действием УЗ волны приходят в движение от поверхности биоткани вглубь, через слой коагуляции, тем самым повреждая целостность этого слоя. Кроме того, на рисунке хорошо видны черные точки, соответствующие окраске серебром кластеров наночастиц (отмечены стрелками). Протяженные темные зоны указывают на равномерное распределение наночастиц, обусловленное дополнительной УЗ обработкой перфорированной кожи. Эти зоны затрагивают дерму и гиподерму, что свидетельствует о том, что только комбинированное воздействие ФЛМА и ультразвука приводит к накоплению наночастиц в глубоких участках кожной ткани.

4. Заключение

Результаты работы показывают принципиальную возможность местно-региональной доставки золотых нанооболочек в глубокие слои кожи и их депонирование в условиях *in vivo*. Однако простое нанесение суспензии наночастиц на интактную кожу не сопровождается изменениями ОКТ-изображений и фотографий гистологических

препаратов, что свидетельствует о практическом отсутствии проникновения наночастиц в кожу посредством пассивной диффузии. Таким образом, для обеспечения значительного накопления наночастиц такого размера в коже необходимо использовать физико-химические воздействия, увеличивающие проницаемость кожи.

Наиболее эффективным из использованных нами физических методов повышения проницаемости представляется фракционная лазерная микроабляция эпидермиса. Создаваемые при помощи данной манипуляции микроотверстия позволяют внедрить наночастицы в дерму и гиподерму, свидетельством чего является увеличение контраста ОКТ-изображений и визуализация зон накопления наночастиц на фотографиях гистологических препаратов.

Ультрасонофорез сам по себе не способствует существенному проникновению наночастиц золота через кожный барьер. Тем не менее его использование в комбинации с фракционной лазерной микроабляцией имеет смысл, поскольку ультразвуковое воздействие способствует более равномерному распределению наночастиц внутри ткани.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ, ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России» (госконтракты № 14.740.11.260, 02.740.11.0484 и 02.740.11.0879), гранта фонда Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-1057.2011.2 и гранта Президента РФ государственной поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-1177.2012.2, гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, а также грантов № 224014 Photonics4Life (FP7) и FiDiPro TEKES (40111/11), Финляндия.

Авторы выражают благодарность Palomar Medical Technologies Inc. (МА, США) за предоставленное оборудование.

- Lee S.H., Jeong S.K., Ahn S.K. *Yonsei Med. J.*, **47**, 293 (2006).
- Berger C.L., Vasquez J.G., Shofner J., Mariwalla K., Edelson R.L. *Int. J. Biochem. Cell B.*, **38**, 1632 (2006).
- Von Stebut E. *Eur. J. Dermatol.*, **17**, 115 (2007).
- Langer R. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **56**, 557 (2004).
- Prausnitz M.R., Langer R. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1261 (2008).
- Desai P., Patlolla R.R., Singh M. *Mol. Membr. Biol.*, **27**, 247 (2010).
- Hunter R.J., Preedy V.R. (Eds). *Nanomedicine in Health and Disease* (Boca Raton: CRS Press, 2011).
- Schaefer H., Redelmeier T.E. *Skin Barrier* (Basel, Switzerland: Karger, 1996).
- Dykman L., Khlebtsov N. *Chem. Soc. Rev.*, DOI: 10.1039/c1cs15166e (2012).
- Farokhzad O.C., Langer R. *ACS Nano*, **3**, 16 (2009).
- De Villiers M.M., Aramwit P., Kwon G.S. (Eds). *Nanotechnology in Drug Delivery* (New York: Springer, 2009).
- Duncan B., Kim C., Rotello V.M. *J. Control. Release*, **148**, 122 (2010).
- Ram B., Gupta, Uday B., Kompella (Eds). *Nanoparticle Technology for Drug Delivery* (New York: Taylor and Francis, 2006).
- Menon G.K. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **54**, s3 (2002).
- Norlen L. *Int. J. Cosmetic. Sci.*, **28**, 397 (2006).
- Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weiss B., Schaefer U.F., Lehr C.M., Wepf R., Sterry W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 159 (2007).
- Reed J.T., Ghadially R., Elias P.M. *Arch. Dermatol.*, **131**, 1134 (1995).
- Otberg N., Richter H., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Sterry W., Lademann J. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 14 (2004).
- Tagami H. *Int. J. Cosmetic. Sci.*, **30**, 413 (2008).
- Clough G., Gush R. *J. Vasc. Res.*, **46**, 267 (2009).
- Lavrijsen A.P., Bowstra J.A., Gooris G.S., Weerheim A., Boddé H.E., Ponc M. *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 619 (1995).

22. Lockley D.J., Howes D., Williams F.M. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **180**, 74 (2002).
23. Sonavane G., Tomoda K., Sano A., Ohshima H., Terada H., Makino K. *Colloid. Surface B*, **65**, 1 (2008).
24. Bolzinger M.-A., Briançon S., Chevalier Y. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **3**, 463 (2011).
25. Ryman-Rasmussen J.P., Riviere J.E., Monteiro-Riviere N.A. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 143 (2007).
26. 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. *Pharm. Res.*, **28**, 2931 (2011).
27. Batheja P., Sheihet L., Kohn J., Singer A.J., Micjniak-Kohn B. *J. Control. Release*, **149**, 159 (2010).
28. Kumar R., Philip A. *Trop. J. Pharmaceut. Res.*, **6**, 633 (2007).
29. Paliwal S., Menon G.K., Mitragotri S. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1095 (2006).
30. Kuchler S., Abdel-Mottaleb M., Lamprecht A., Radowski M.R., Haag R., Schäfer-Korting M. *Int. J. Pharm.*, **377**, 169 (2009).
31. Coulman S.A., Anstey A., Gateley C., Morrissey A., McLoughlin P., Allender C., Birchall J.C. *Int. J. Pharm.*, **366**, 190 (2009).
32. Doukas A.G., Kollias N. *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **56**, 559 (2004).
33. Генина Э.А., Долотов Л.Е., Башкатов А.Н., Терентюк Г.С., Маслякова Г.Н., Зубкина Е.А., Тучин В.В., Ярославский И.В., Альтшулер Г.Б. *Квантовая электроника*, **41**, 396 (2011).
34. Tomoda K., Terashima H., Suzuki K., Inagi T., Terada H., Makino K. *Colloid Surface B*, **88**, 706 (2011).
35. Mortensen L.J., Oberdorster G., Pentland A.P., Delouise L.A. *Nano Lett.*, **8**, 2779 (2008).
36. Funke A.P., Schiller R., Motzkus H.W., Gunther C., Muller R.H., Lipp R. *Pharmaceut. Res.*, **19**, 661 (2002).
37. Devireddy R.V. *Molecular Reproduction and Development*, **70**, 333 (2005).
38. Elsayed M.M.A., Abdallah O.Y., Naggat V.F., Khalafallah N.M. *Int. J. Pharm.*, **322**, 1 (2007).
39. Uner M., Yener G. *Int. J. Nanomedicine*, **2**, 289 (2007).
40. Guterres S.S., Alves M.P., Pohlmann A.P. *Drug Target Insights*, **2**, 147 (2007).
41. Cross S.E., Innes B., Roberts S.B., Tsuzuki T., Robertson T.A., McCormick P. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **20**, 148 (2007).
42. Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López-Quintela M.A. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1701 (2007).
43. Larese F.F., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Renzi N., Bovenzi M., Maina G. *Toxicology*, **255**, 33 (2009).
44. Filon F.L., Crosera M., Adami G., Bovenzi M., Rossi F., Maina G. *Nanotoxicology*, **5**, 493 (2011).
45. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. *J. Quant. Spectr. Radiat. Transfer*, **111**, 1 (2010).
46. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 1647 (2011).
47. Llevot A., Astruc D. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 242 (2012).
48. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, DOI: 10.1039/c1cs15237h (2012).
49. Chen X. *Theranostics*, **1**, 1 (2011).
50. Khlebtsov B., Panfilova E., Khanadeev V., Bibikova O., Terentyuk G., Ivanov A., Rummyantseva V., Shilov I., Ryabova A., Loshchenov V., Khlebtsov N. *ACS Nano*, **5**, 7077 (2011).
51. Tahara Y., Honda S., Kamiya N., Piao H., Hirata A., Hayakawa E., Fujii T., Goto M. *J. Control. Release*, **131**, 14 (2008).
52. Pissuwan D., Nose K., Kurihara R., Kaneko K., Tahara Y., Kamiya N., Goto M., Katayama Y., Niidome T. *Small*, **7**, 215 (2010).
53. Хлебцов Б. Н., Ханадеев В. А., Максимова И.Л., Терентюк Г.С., Хлебцов Н. Г. *Российские нанотехнологии*, **5**, 54 (2010).
54. Ye J., Van de Broek B., De Palma R., Libaers W., Clays K., Van Roy W., Borghs G., Maes G. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **322**, 225 (2008).
55. Lillie R.D. *Histopathologic Technique and Practical Histochemistry* (New York: McGraw-Hill, 1965).
56. Cang H., Sun T., Li Z.-Y., Chen J., Wiley B.J., Xia Y. *Opt. Lett.*, **30** (22), 3048 (2005).
57. Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood* (Bellingham, Washington: SPIE Press, 2005).
58. Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, Washington: SPIE Press, 2007).
59. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (М.: Физматлит, 2010).