

# Фракционная лазерная микроабляция кожи: повышение эффективности чрескожной доставки частиц

Э.А.Генина, Л.Е.Долотов, А.Н.Башкатов, В.В.Тучин

*Исследованы несколько режимов фракционной лазерной микроабляции с помощью импульсного Er:YAG-лазера для создания in vivo в коже человека микроканалов различной глубины и насечек, позволяющих осуществлять чрескожную доставку частиц различных размеров:  $Al_2O_3$  (~27 мкм),  $ZrO_2$  (менее 5 мкм) и  $TiO_2$  (менее 100 нм). Режим ударной волны использовался как для улучшения внедрения частиц в зоны абляции, так и в качестве самостоятельного метода доставки частиц в кожу. С помощью оптической когерентной томографии оценивалась когерентная глубина детектирования частиц в коже через 2 часа, 3 дня и 10 дней после внедрения. Максимальная глубина локализации (до 450 мкм) получена при использовании наночастиц  $TiO_2$  и режиме создания насечек с внедрением частиц с помощью импульсов многолучевой гидродинамической ударной волны. Результаты исследования могут быть полезны для разработки новых методов чрескожной доставки микро- и наночастиц лекарственных препаратов.*

**Ключевые слова:** фракционная лазерная микроабляция, кожа, доставка микрочастиц и наночастиц, гидродинамическая ударная волна, оптическая когерентная томография.

## 1. Введение

Доставка микро- и наночастиц через кожу привлекает большое внимание исследователей. В частности, целый ряд работ посвящён внедрению наночастиц диоксида титана в поверхностные слои кожи с целью создания ультрафиолетового (УФ) фильтра [1–3]. Наночастицы эффективно используются как в качестве контрастирующих агентов при визуализации внутритканевых неоднородностей [4–6], так и для доставки лекарственных препаратов и создания внутридермального депо [7–9]. Разномасштабные биосовместимые микрочастицы различных типов также могут служить в качестве контейнеров для трансдермального транспорта препаратов [10, 11]. К основным преимуществам чрескожной доставки препаратов относятся: 1) минимальная инвазивность или даже неинвазивность; 2) улучшенная фармакокинетика; 3) направленность [12].

Среди методов, позволяющих преодолевать эпидермальный слой кожи, который является естественным барьером, препятствующим проникновению экзогенных веществ и частиц во внутренние слои дермы, наиболее часто предлагаются: 1) использование естественных транспортных путей, т. е. придатков кожи (волосяные фолли-

кулы и сальные железы) [7, 12–15]; 2) создание искусственных каналов (различные способы микропорации) [8, 12, 13–19].

Придатки кожи являются путями для неинвазивной и в ряде случаев достаточно эффективной доставки наночастиц. Однако отмечается, что частицы диаметром ~100 нм и более не могут выйти из придатков кожи в окружающую ткань [20]. В отличие от наночастиц, микрочастицы диаметром 9–10 мкм не проникают ни в фолликулярные отверстия, ни в роговой слой, а концентрируются вокруг устьев фолликулов [21]. Малые микросферы (менее 3 мкм) хорошо проникают в кожные придатки, но наблюдаются только в поверхностных слоях рогового слоя эпидермиса и никогда в живом эпидермисе [22]. Таким образом, при необходимости введения в дерму частиц субмикронного и микронного размеров предпочтительным способом является создание в коже искусственных микроканалов.

Фракционная лазерная микроабляция (ФЛМА) является достаточно эффективным и безопасным методом микропорации кожи, позволяющим создавать ее термические микроповреждения различного диаметра и различной глубины в зависимости от параметров лазерного воздействия [18, 23–31].

Лазеры, используемые для абляции ткани, генерируют излучение на длинах волн, совпадающих с полосами поглощения воды, например: Er:YAG-лазер (2940 нм) и  $CO_2$ -лазер (10600 нм) [26]; наиболее часто для перфорации кожи используется Er:YAG-лазер. Так, с помощью микроимпульсного воздействия Er:YAG-лазера можно создавать вертикальные микроканалы глубиной от 20 до 500 мкм и диаметром от 50 до 200 мкм [18, 23, 25, 29, 30], а также горизонтальные разрезы длиной 5 мм и глубиной от 150 до 300 мкм [24]. В работе [31] продемонстрирована возможность с помощью ФЛМА создавать каналы в ткани in vitro глубиной до 2 мм. Глубина абляции, получаемая с помощью излучения  $CO_2$ -лазера, обычно меньше, чем при воздействии излучением Er:YAG-лазера [26].

**Э.А.Генина, А.Н.Башкатов.** Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Томский национальный исследовательский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; e-mail: eagenina@yandex.ru

**Л.Е.Долотов.** Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83

**В.В.Тучин.** Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского; Томский национальный исследовательский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; e-mail: tuchinv@mail.ru

Поступила в редакцию 21 апреля 2016 г.

Основным преимуществом ФЛМА по сравнению, например, с микроигльной порацией или традиционной инъекцией состоит в предотвращении инфицирования создаваемых каналов за счёт бесконтактного термического воздействия. При этом окружающая ткань при ФЛМА остаётся практически неповреждённой и является ресурсом для восстановления повреждённой ткани [32]. Полное заживление эпидермиса и восстановление функции кожного барьера при разных источниках излучения и режимах абляции составляет от одного-двух дней [33] до недели [24, 34].

ФЛМА используется для улучшения проницаемости кожи для частиц различных типов и размеров. В частности, ранее нами были представлены результаты доставки в дерму микрочастиц  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (~27 мкм) [23] и  $\text{ZrO}_2$  (менее 5 мкм) [31], наночастиц  $\text{TiO}_2$  (менее 100 нм) [23, 24], золотых наноклеток (~40 нм) [25], ап-конверсионных наночастиц (~1.6 мкм) и квантовых точек (~20 нм) [35] при предварительной абляции кожи с помощью излучения Er:YAG-лазера. Однако проблема повышения эффективности чрескожной доставки частиц остаётся по-прежнему актуальной. При этом возможности ФЛМА далеко не исчерпаны и требуют дальнейших исследований и развития. В частности, нерешёнными остаются проблемы выхода основной массы частиц из неглубоких (до 100 мкм) каналов, образующихся при малой мощности лазерных импульсов [24], а также повреждения кожи при повышении мощности ФЛМА [23, 24]. Исследованный ранее на образцах кожи свиньи *in vitro* режим гидродинамической волны [31] показал, что эффективность внедрения частиц в более глубокие слои кожи повышается. Однако *in vivo* такие исследования не проводились.

Целями настоящей работы являются тестирование различных режимов ФЛМА для разработки методов повышения эффективности доставки микро- и наночастиц в дерму кожи и мониторинг выведения частиц из организма.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Частицы

В работе в качестве разномасштабных тестовых агентов использовались частицы диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ , характерный размер менее 100 нм) (634662-100G, Sigma-Aldrich Co., США), оксида циркония ( $\text{ZrO}_2$ , ~5 мкм) (Sigma-Aldrich Co., США) и оксида алюминия ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , ~27 мкм) (LOMO PLC, Россия).

Все три типа частиц являются биосовместимыми. Хорошо известно, что наночастицы  $\text{TiO}_2$  широко используются в косметической продукции для защиты кожи от УФ излучения [1–3].  $\text{Al}_2\text{O}_3$  является инертным веществом, также часто используемым в косметике в качестве абразива, абсорбента, наполнителя и пр. [36], а  $\text{ZrO}_2$  представляет собой керамический материал, применяемый в стоматологии для изготовления зубных протезов [37]. Эксперименты *in vivo* на коже кролика продемонстрировали биосовместимость  $\text{ZrO}_2$  [38]. Данные частицы обладают очень слабым поглощением для излучения, используемого при работе томографа (930 ± 50 нм) [39–42], поэтому комплексной частью их показателей преломления можно пренебречь. Концентрация частиц в суспензиях составляла 0.5 г/мл. Плотность частиц  $\text{TiO}_2$  была равна ~4 г/см<sup>3</sup> [43],  $\text{ZrO}_2$  – 5.89 г/см<sup>3</sup> [44],  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 3.9 г/см<sup>3</sup> [45–47]. Для частиц диоксида титана концентрация оценивалась в ~2.4

× 10<sup>14</sup> шт./см<sup>3</sup>, диоксида циркония в ~1.3 × 10<sup>9</sup> шт./см<sup>3</sup>, оксида алюминия в ~1.2 × 10<sup>7</sup> шт./см<sup>3</sup>.

Показатели преломления частиц  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  соответственно оценивались с помощью следующих дисперсионных формул:

$$n^2 = 5.913 + \frac{0.2441}{\lambda^2 - 0.0803} \quad ([48]),$$

$$n^2 - 1 = \frac{1.347091\lambda^2}{\lambda^2 - 0.062543^2} + \frac{2.117788\lambda^2}{\lambda^2 - 0.166739^2} + \frac{9.452943\lambda^2}{\lambda^2 - 24.32057^2} \quad ([49]),$$

$$n^2 - 1 = \frac{1.4313493\lambda^2}{\lambda^2 - 0.0726631^2} + \frac{0.65054713\lambda^2}{\lambda^2 - 0.1193242^2} + \frac{5.3414021\lambda^2}{\lambda^2 - 18.028251^2} \quad ([50]),$$

где  $\lambda$  берётся в микрометрах. Таким образом, на длине волны 0.93 мкм показатели преломления  $n$  таковы:  $n_{\text{TiO}_2} = 2.4948$ ,  $n_{\text{ZrO}_2} = 2.1278$ ,  $n_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 1.7571$ .

Водные суспензии частиц приготавливались непосредственно перед исследованиями с помощью ультразвуковой (УЗ) ванны СТ-400А (CTBrand, Wan Luen Electronic Tools Co. Ltd, Китай).

### 2.2. Лазерная система

Для ФЛМА использовалась стандартная система на основе Er:YAG-лазера StarLux/Lux2940 (Palomar Medical Technologies Inc., Burlington, MA, США) в режиме генерации одного или шести импульсов (рис.1). Система оснащена портативными фракционными насадками 1, с помощью которых на коже создавались участки абляции. Это достигалось системой линз 2, расщепляющих первоначальный пучок на соответствующее количество пучков. Чтобы положение фокуса совпадало с поверхностью кожи, расстояние между поверхностью линз и её поверх-

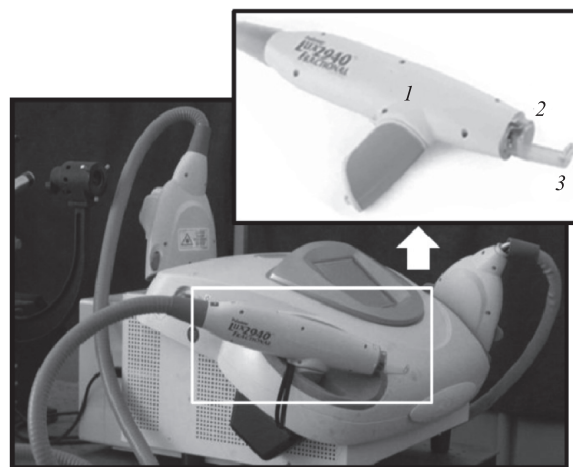


Рис.1. Внешний вид лазерной системы StarLux/Lux2940 со сменной портативной насадкой (вставка): 1 – насадка Lux2940 для фракционной микроабляции; 2 – система линз, позволяющая создавать зоны абляции в форме сетки микроканалов или насечек; 3 – фиксатор, позволяющий совместить фокус с поверхностью кожи.

ностью жёстко фиксировалось с помощью специального приспособления 3. Различные насадки позволяли одновременно получать сетку из 169 микроканалов на площади  $6 \times 6 \text{ мм}^2$  или пяти насечек на площади  $5 \times 5 \text{ мм}^2$  (увеличенные изображения представлены на рис.2).

Глубина каналов и насечек зависела от энергии и длительности импульсов. Временной профиль импульса представлял собой серию пиков длительностью  $135 \pm 5 \text{ мс}$  каждый. В одноимпульсном режиме при энергии 1 Дж и длительности 5 мс лазерный импульс содержал один пик, а при энергии 2 Дж и длительности импульса 10 мс структура импульса была двухпиковой. При одинаковых параметрах лазерного импульса, помимо различной формы зон абляции, повреждения кожи, возникающие при использовании каналов и насечек, имели существенно различающиеся размеры. Под действием одиночного лазерного импульса с энергией 1 Дж в режиме создания микроканалов формировались участки абляции глубиной  $\sim 100 \text{ мкм}$  и диаметром  $\sim 50 \text{ мкм}$ . При тех же параметрах лазерного импульса в режиме создания насечек глубина повреждённого участка составляла  $\sim 200 \text{ мкм}$ , ширина  $\sim 100 \text{ мкм}$ . При использовании лазерного импульса с энергией 2 Дж в режиме создания каналов их глубина составляла  $\sim 150 \text{ мкм}$ , диаметр  $\sim 70 \text{ мкм}$ ; глубина насечек составляла  $\sim 300 \text{ мкм}$ , ширина  $\sim 250 \text{ мкм}$ . Таким образом, объём суспензии, вводимой в кожу, также был существенно различен.

Для осуществления режима ударной волны на поверхность кожи, покрытую суспензией частиц, помещалась сапфировая пластина толщиной 0.5 мм. Лазерные пучки фокусировались на границе между сапфировой пластинкой и суспензией. Толщина слоя суспензии составляла  $\sim 0.5 \text{ мм}$ . Параметры лазерного излучения были следующими: энергия импульса 3 Дж, длительность 30 мс, структура трёхпиковая. Поскольку используемые частицы очень слабо поглощают свет в области длин волн генерации лазерного импульса (2.94 мкм), а вода, напротив,

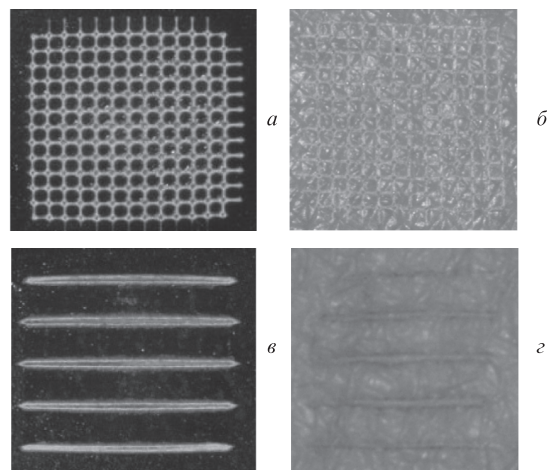


Рис.2. Результат ФЛМА в режимах создания каналов (а, б) и насечек (в, з) на чёрной бумаге (а, в) и на коже (б, з). Каналы располагаются в узлах решётки, расстояние между ними составляет 0.5 мм, между насечками – 1.2 мм.

имеет в данной области чрезвычайно высокое поглощение, то происходит взрывное поглощение энергии водой, являющейся основой суспензии, которая, резко расширяясь в области фокуса лазерного пучка, вызывает образование гидродинамической волны.

### 2.3. Описание экспериментов

В зависимости от режима ФЛМА было проведено три серии экспериментов:

1. Один импульс с энергией 1 Дж и длительностью 5 мс.
2. Шесть отдельных импульсов (2 Дж, 10 мс каждый) с поворотом насадки вокруг своей оси.
3. Шесть отдельных импульсов (2 Дж, 10 мс каждый) в режиме ударной волны.

Табл.1. Режимы фракционной лазерной микроабляции кожи и способы внедрения разномасштабных частиц.

Номер серии	Номер эксперимента	Частицы	Режим ФЛМА				Способ внедрения
			Число импульсов	Длительность импульса (мс)	Энергия импульса (Дж)	Форма участков абляции	
1	1.1					Каналы	Нанесение УЗ (0.3 Вт/см <sup>2</sup> , 1 МГц, 1 мин)
	1.2	TiO <sub>2</sub>	1	5	1	Каналы	
	1.3					Насечки	
2	2.1					Каналы с поворотом по кругу	Массаж (5 мин)
	2.2					«←→»	Шесть импульсов ударной волны
	2.3	TiO <sub>2</sub>	6	10	2	Насечки с поворотом по кругу	Массаж (5 мин)
	2.4					«←→»	Шесть импульсов ударной волны
	2.5					Каналы с поворотом по кругу	Массаж (5 мин)
	2.6	ZrO <sub>2</sub>	6	10	2	«←→»	Шесть импульсов ударной волны
	2.7					«←→»	Массаж (5 мин)
	2.8	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6	10	2	«←→»	Шесть импульсов ударной волны
3	3.1	TiO <sub>2</sub>	–	–	–	–	Шесть импульсов ударной волны
	3.2	ZrO <sub>2</sub>	–	–	–	–	«←→»

Поворот насадок осуществлялся с целью увеличения числа каналов и насечек в зоне воздействия для повышения количества частиц, внедрённых в кожу.

В первой серии экспериментов использовалась суспензия только  $TiO_2$ -частиц, во второй –  $TiO_2$ -,  $ZrO_2$ - и  $Al_2O_3$ -частиц, в третьей –  $TiO_2$ - и  $ZrO_2$ -частиц. В первой и второй сериях суспензии наносились на поверхность кожи после ФЛМА. В третьей серии экспериментов ФЛМА кожи не проводилось, а частицы наносились на интактную поверхность. Для улучшения проникновения частиц в кожу использовались ручной массаж (в качестве мягкого механического усилителя проницаемости кожи) в течение 5 мин, низкочастотное УЗ воздействие ( $0.3 \text{ Вт/см}^2$ , 1 МГц) в течение 1 мин или воздействие гидродинамической ударной волны (шесть импульсов с энергией 3 Дж и длительностью 30 мс каждый), генерируемой в слое суспензии частиц на поверхности кожи. Параметры лазерного воздействия в различных режимах и способы внедрения суспензий частиц в кожу человека *in vivo* представлены в табл.1. Суспензия наносилась на кожу с избытком, чтобы по возможности заполнить каналы и насечки на всю глубину. Излишки суспензии тщательно удалялись с поверхности кожи с помощью дистиллированной воды.

Дополнительного исследования проникновения частиц в интактную кожу без какого-либо стимулирующего воздействия нами не проводилось, поскольку такое контрольное исследование проникновения наночастиц  $TiO_2$  (~100 нм) в интактную кожу *ex vivo* и *in vivo* подробно описано в работе [23]. Результаты показали, что глубина проникновения частиц в течение 24 часов ограничивается устьями волосяных фолликулов и желёз кожи, а также естественными углублениями на поверхности эпидермиса.

В экспериментах принимали участие пять добровольцев (мужчины в возрасте от 42 до 65 лет). Исследуемая область (кожа предплечья) разделялась на участки, каждый из которых обрабатывался с помощью определённого режима ФЛМА. Для контроля состояния кожи в каждую серию включались два дополнительных участка: с ФЛМА без внедрения частиц и без какого-либо воздействия (интактные).

Для мониторинга состояния кожи до и после ФЛМА, глубины внедрения частиц и процесса естественного выведения частиц из каналов использовалась оптическая когерентная томография (ОКТ). Исследования проводились с помощью стандартной ОКТ-системы ОСР930SR (Thorlabs, США) со следующими параметрами: центральная длина волны источника излучения 930 нм, ширина полосы излучения 100 нм, аксиальное и латеральное разрешение соответственно 6.2 и 9.6 мкм (на воздухе), длина области сканирования 3 мм.

На основе ОКТ-сканирования оценивалась глубина когерентного детектирования (ГКД)  $\delta$  частиц внутри ткани. Эта величина определялась как расстояние между положением, соответствующим максимуму интенсивности сигнала от поверхности ткани, и положением, отвечающим нижней границе наблюдения полезного сигнала из глубины ткани в области локализации частиц (рис.3). ОКТ-сигналы усреднялись по 21 А-скану, соответствующему участку кожи длиной ~60 мкм. Агрегация исследуемых частиц в водной среде не оказывала влияния на ОКТ-изображения каналов вследствие высокой концентрации частиц в суспензии.

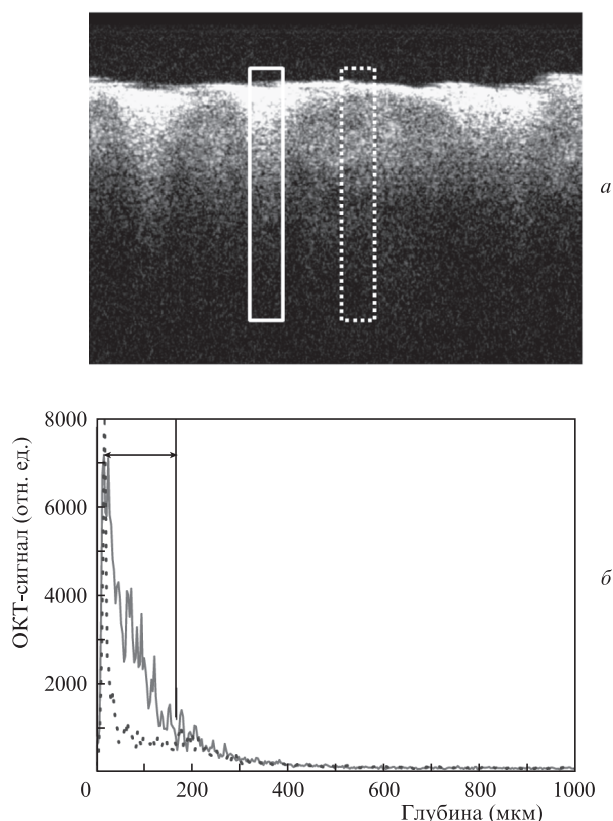


Рис.3. Определение глубины когерентного детектирования  $\delta$  на основе анализа распределения интенсивности сигнала на ОКТ-изображении участка кожи после ФЛМА и нанесения суспензии частиц (левый прямоугольник – область канала в коже, заполненного частицами, правый – участок между каналами) (а) и распределения ОКТ-сигналов по глубине кожи внутри канала (сплошная кривая) и между каналами (пунктир) (б).

Наблюдения проводились через 2 часа, 3 дня и 10 дней после внедрения частиц.

### 3. Результаты и их обсуждение

На рис.4 представлены результаты первой серии экспериментов через 3 дня и через 10 дней после ФЛМА и внедрения наночастиц  $TiO_2$ . Число в правом верхнем углу означает номер эксперимента, соответствующий приведенному в табл. 1. Стрелками обозначены каналы и насечки в коже, заполненные суспензией частиц.

На рис.4 (1.1 и 1.2) хорошо видно, что в результате воздействия одного импульса с энергией 1 Дж в режиме

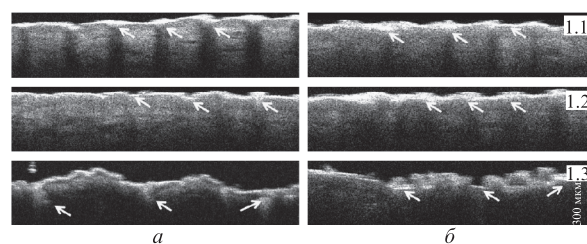


Рис.4. ОКТ-изображения участков кожи человека *in vivo* через 3 дня (а) и через 10 дней (б) после ФЛМА (один импульс с длительностью 5 мс и энергией 1 Дж) в режимах создания каналов (1.1, 1.2) и насечек (1.3), а также нанесения частиц  $TiO_2$  без дополнительного воздействия (1.1 и 1.3) и с УЗ обработкой (1.2). Числа соответствуют номерам экспериментов в табл.1, стрелками обозначены каналы и насечки, заполненные частицами, и области локализации частиц после заживления участков абляции.

Табл.2. Глубина когерентного детектирования частиц в коже человека *in vivo* при различных режимах фракционной лазерной микроабляции и способах внедрения суспензий разномасштабных частиц (приведено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение).

Номер серии	Номер эксперимента	Глубина когерентного детектирования частиц (мкм)		
		Сразу после внедрения частиц	Через 3 дня	Через 10 дней
1	1.1	92 $\pm$ 10	63 $\pm$ 16	70 $\pm$ 17
	1.2	98 $\pm$ 12	55 $\pm$ 31	63 $\pm$ 19
	1.3	205 $\pm$ 9	200 $\pm$ 17	130 $\pm$ 17
2	2.1	124 $\pm$ 36	225 $\pm$ 71	120 $\pm$ 42
	2.2	176 $\pm$ 47	100 $\pm$ 45	225 $\pm$ 21
	2.3	201 $\pm$ 43	240 $\pm$ 90	170 $\pm$ 35
	2.4	188 $\pm$ 45	225 $\pm$ 21	350 $\pm$ 125
	2.5	141 $\pm$ 23	175 $\pm$ 40	120 $\pm$ 30
	2.6	110 $\pm$ 24	120 $\pm$ 30	233 $\pm$ 51
	2.7	Не наблюдаются	Не наблюдаются	Не наблюдаются
	2.8	186 $\pm$ 25	140 $\pm$ 46	170 $\pm$ 46
3	3.1	175 $\pm$ 23	123 $\pm$ 15	105 $\pm$ 17
	3.2	215 $\pm$ 48	171 $\pm$ 18	165 $\pm$ 17

создания микроканалов в коже образуются небольшие повреждения, при этом частицы проникают на глубину менее 100 мкм. УЗ воздействие существенно не увеличивает глубину внедрения частиц в кожу. В отличие от режима микроканалов, режим создания насечек позволяет увеличить глубину внедрения частиц при тех же параметрах лазерного воздействия. На рис.4 (1.3) видно, что глубина микронасечек, заполненных суспензией, составляет около 200 мкм.

В табл.2 представлены результаты измерения ГКД частиц в каналах и насечках на ОКТ-изображениях кожи, усреднённые по всем доступным изображениям, и стандартное отклонение.

С течением времени в местах абляции возникали струпы, которые содержали наночастицы. На рис.4 (1.1 и 1.2) они хорошо заметны – это выступающие образования на поверхности кожи над каналами (отмечены стрелками). В режиме создания насечек струп образовывался на всём участке воздействия (рис.4,б, режим 1.3), при этом каналы выглядели как углубления. При одноимпульсном режиме из-за малой глубины проникновения большая часть частиц естественным образом выталкивалась на поверхность и удалялась вместе со струпом. Через 10 дней после ФЛМА частицы видны только на поверхности кожи.

Во второй серии экспериментов (после шести последовательных импульсов) наблюдалось появление множественных зон абляции. Под действием многократных импульсов каналы и насечки частично накладывались друг на друга, что увеличивало диаметр каналов и ширину насечек. На некоторых участках кожи диаметр повреждённых областей достигал 500 мкм. Массаж способствовал заполнению их суспензией на оптическую глубину до 160 мкм (каналы) и до 250 мкм (насечки). При использовании для внедрения частиц  $\text{TiO}_2$  в каналы ударной волны ГКД увеличивалась более чем на 50 мкм, в случае же внедрения частиц в насечки глубина уменьшалась (табл.2), что может являться артефактом, поскольку обширные зоны локализации частиц создавали отражающий экран, препятствующий проникновению света в глубь зон абляции и затрудняющий оценку их глубины. При этом как каналы, так и насечки значительно деформировались, поскольку ударная волна повреждала поверхность кожи

между зонами абляции, и частицы локализовывались относительно равномерно по всей глубине.

На рис.5 и 6 демонстрируются результаты второй серии экспериментов в режимах каналов и насечек соответственно через 2 часа, 3 дня и через 10 дней после ФЛМА и внедрения частиц. На контрольном участке без внедрения частиц (первая строка рис.5) каналы практически не визуализируются. Через 3 дня образовывался небольшой струп только на участках повреждения, который полностью удалялся с поверхности кожи в течение 10 дней. На рисунке заметны только участки небольшого шелушения. Наблюдение за динамикой изменения ОКТ-изображений контрольных участков кожи позволило убедиться, что при формировании и развитии на поверхности кожи струпов образования каких-либо контрастных участков в глубине ткани не наблюдалось, а следовательно, контрастные участки могут быть отнесены к локальным областям, заполненным частицами.

При внедрении суспензии частиц  $\text{TiO}_2$  и  $\text{ZrO}_2$  в каналы (рис.5,а) с помощью как массажа (режимы 2.1 и 2.5), так и ударной волны (режимы 2.2 и 2.6), каналы становятся хорошо заметными, что позволяет оценить ГКД частиц. Обращает на себя внимание то, что ударная волна способствовала более глубокому внедрению и относительно равномерному распределению наночастиц  $\text{TiO}_2$  (рис.5,а, режим 2.2) по сравнению с микрочастицами  $\text{ZrO}_2$  (режим 2.6). В случае внедрения наиболее крупных частиц  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (рис.5, изображения 2.7) каналы не визуализируются, поскольку под действием массажа частицы, повидимому, заполнили только устья каналов и были удалены при смывании суспензии с поверхности кожи перед ОКТ. Ударная волна позволила доставить микрочастицы в более глубокие слои кожи. Небольшие равномерно распределённые контрастные участки на рис.5,а (режим 2.8) свидетельствуют о проникновении единичных частиц в дерму на глубину более 200 мкм.

Через 3 дня для всех типов используемых частиц хорошо визуализировались только частицы в каналах (рис.5,б, режимы 2.1 и 2.5) и насечках (режим 2.3) без применения ударной волны. Поскольку ударная волна создавала поверхностное повреждение кожи на всей площади воздействия, то частицы, заполняя не только сами каналы и на-

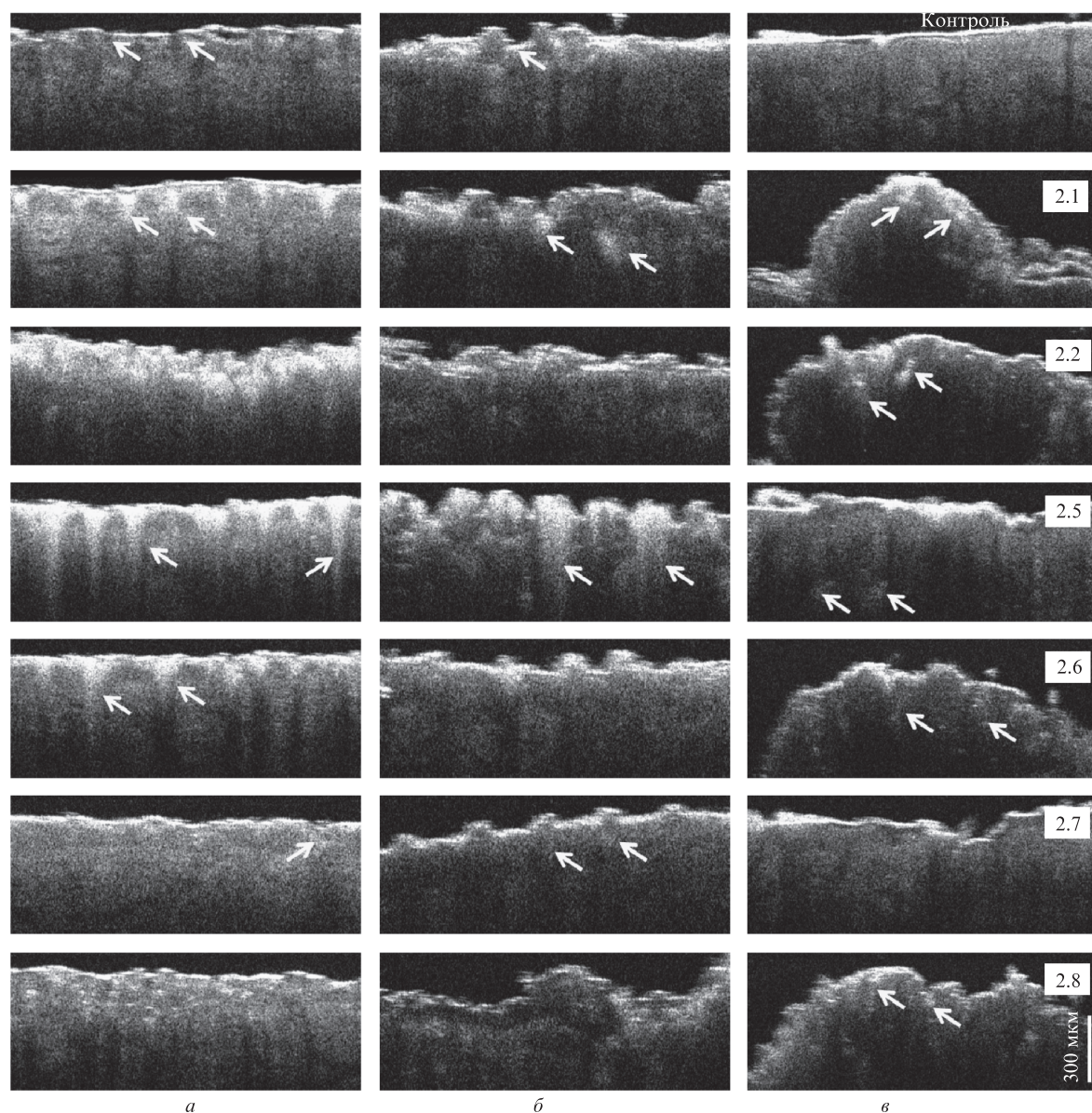


Рис.5. ОКТ-изображения участков кожи человека *in vivo* через 2 часа (*а*), 3 дня (*б*) и 10 дней (*в*) после ФЛМА (шесть импульсов с длительностью 10 мс и энергией 2 Дж) в режимах создания каналов, нанесения частиц и их внедрения с помощью массажа (2.1, 2.5 и 2.7) или ударной волны (2.2, 2.6 и 2.8). Частицам  $TiO_2$  соответствуют изображения 2.1 и 2.2,  $ZrO_2$  – 2.5 и 2.6,  $Al_2O_3$  – 2.7 и 2.8. Числа соответствуют номерам экспериментов в табл.1, стрелками обозначены каналы, заполненные частицами, и области локализации частиц после заживления участков абляции.

сечки, но и промежутки между ними, формировали более или менее непрерывный отражающий экран, снижающий интенсивность света, проникшего в глубь ткани, и затрудняющий визуализацию (режимы 2.2, 2.6 на рис.5,*б* и 2.4 на рис.6,*б*). Об образовании отражающего экрана на поверхности кожи на участках локализации частиц можно судить по уменьшению оптической глубины зондирования по сравнению с контрольными измерениями (верхняя строка на рис.5).

При наблюдении через 10 дней на всех участках визуализировался единый струп с частицами, находящимися внутри каналов. В случае естественного удаления струпа частицы могли оставаться на дне каналов или насечек, однако основная их масса удалялась при отшелушивании струпа. При внедрении частиц с помощью ударной волны наночастицы  $TiO_2$  наблюдались также в волосяных фолликулах на глубине до 450 мкм (рис.6,*в*, режим 2.4).

Заполнения фолликулов более крупными частицами ( $ZrO_2$  и  $Al_2O_3$ ) под действием массажа или ударной волны не наблюдалось.

На рис.7 представлены участки кожи через 2 часа и через 10 дней после воздействия ударной волны без предварительной ФЛМА (третья серия экспериментов). Частицы  $TiO_2$  (режим 3.1) и  $ZrO_2$  (режим 3.2) внедрялись в неповрежденную кожу, поэтому они распределены более однородно, чем при предварительной абляции. Периодичность, наблюдаемая на данных изображениях, вызвана тем, что ударная волна генерировалась той же системой линз, которая использовалась для создания каналов. Большая яркость изображений через 2 часа после нанесения частиц (рис.7,*а*) связана с тем, что суспензия покрывает практически всю поверхность обработанного участка кожи и вносит существенный вклад в отражение от её поверхности, что значительно увеличивает ОКТ-сигнал в

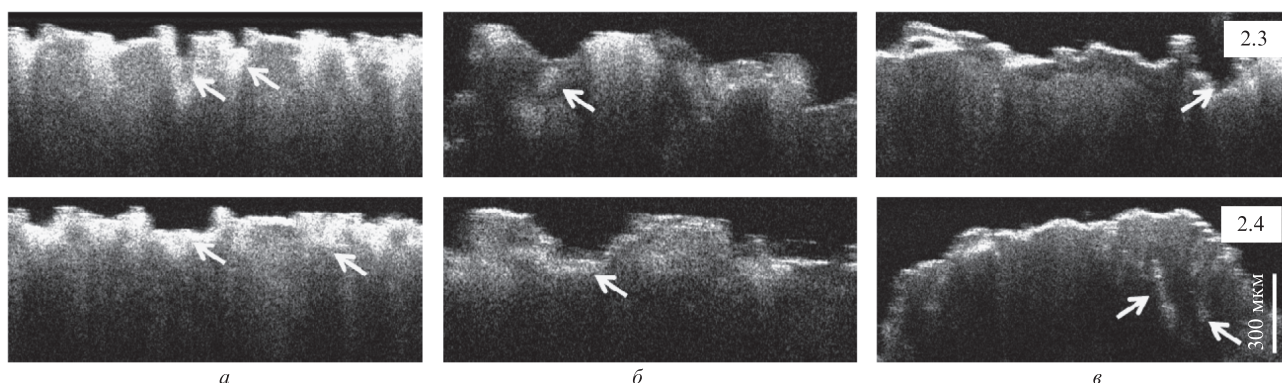


Рис.6. ОКТ-изображения участков кожи человека *in vivo* через 2 часа (а), 3 дня (б) и 10 дней (в) после ФЛМА (шесть импульсов с длительностью 10 мс и энергией 2 Дж) в режиме создания насечек, нанесения наночастиц  $\text{TiO}_2$  и их внедрения помощью массажа (2.3) или ударной волны (2.4). Числа соответствуют номерам экспериментов в табл.1, стрелками обозначены насечки, заполненные частицами, и области локализации частиц после заживления участков абляции.

этой области [51]. Кажущаяся меньшая глубина проникновения наночастиц  $\text{TiO}_2$  по сравнению с частицами  $\text{ZrO}_2$  обусловлена, по-видимому, созданием более плотного экрана на поверхности кожи, препятствующего визуализации её глубоких слоёв. На ОКТ-изображениях, полученных через 10 дней, хорошо видно, что при образовании струпа отражающий экран уплотняется и существенно снижает оптическую глубину зондирования. Вероятно, с этим связано и уменьшение ГКД частиц (табл.2). Основными путями проникновения наночастиц в глубь кожи при таком способе внедрения частиц могут служить, на наш взгляд, волосяные фолликулы и поры. Достаточно крупные микрочастицы будут оставаться на поверхности, включаться в струп и удаляться вместе с ним в процессе отшелушивания.

Из представленных результатов следует, что при малой энергии лазерного воздействия в режиме создания микроканалов повреждений кожи на участках между зонами абляции не наблюдается, и это способствует их быстрому заживлению. Однако глубина доставки частиц в данном случае не превышает 100 мкм (при этом, учитывая показатель преломления эпидермиса ( $n \approx 1.43$  [52]), физическая глубина составляет  $\sim 70$  мкм), что соответствует границе между эпидермисом и дермой. Частицы, включённые в эпидермис, удаляются из организма в течение периода его обновления, равного двум-четырем неделям [53].

Из табл.2 следует, что наиболее эффективным способом внедрения частиц с точки зрения глубины их проникновения является предварительное создание зон абляции в коже и последующее воздействие ударной волной. Глубина внедрения частиц при этом позволяет им задерживаться в дерме на достаточно длительный период вре-

мени. В частности, в работе [23] показано, что частицы, доставленные посредством ФЛМА на глубину 230 мкм, оставались в коже в течение месяца. Гистологический анализ показал, что при создании насечек глубиной  $\sim 400$  мкм частицы, помещённые в каналы, оставались в дерме и после полного заживления кожи [24].

Улучшение проницаемости кожи под действием ФЛМА для различных макромолекул отмечено в работах [18, 26–29]. Сообщается, что фолликулярная проницаемость также увеличивается в результате снижения барьерной функции эпителия [54]. При образовании каналов или насечек в коже могут повреждаться в том числе и капсулы волосяных фолликулов, что делает возможным проникновение в них частиц под действием ударной волны на достаточно большую глубину. Изображение, представленное на рис.6,б (режим 2.4), позволяет предположить, что частицы находятся в волосяном фолликуле, поскольку ГКД в данном случае ( $\sim 450$  мкм) превышает глубину насечек.

Большого различия в ГКД между частицами размером от 0.1 до 5 мкм при данных режимах ФЛМА не наблюдается, однако для доставки более крупных частиц ( $\sim 30$  мкм) необходимо увеличить глубину каналов путём повышения энергии лазерных импульсов. Эффективным методом является также комбинация ФЛМА и воздействия гидродинамической ударной волны.

#### 4. Заключение

Решению проблем доставки лекарственных препаратов и фотосенсибилизаторов, загруженных в микро- и наноконтейнеры, в кожу *in vivo* и создания в ней долговременного депо посвящено большое количество работ. Особый интерес вызывает разработка биодеградируемых частиц и методов, позволяющих осуществлять управляемое высвобождение их содержимого. Однако большинство полимерных микро- и наноконтейнеров требуют применения флуоресцентных меток и сложной оптической техники для их визуализации в биотканях. В работе исследовались разноразмерные частицы, имеющие высокий контраст на ОКТ-изображениях биотканей и используемые для тестирования различных режимов ФЛМА, в которых создаются микроканалы и микронасечки различных размеров, а также режим многопучковой гидродинамической ударной волны. Впервые исследована возможность использования ударной волны как

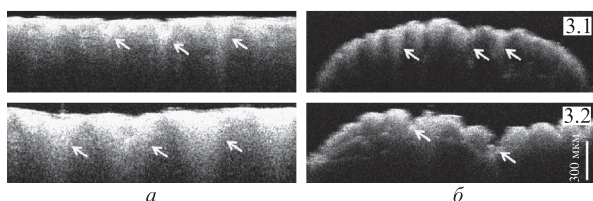


Рис.7. ОКТ-изображения участков кожи человека *in vivo* через 2 часа (а) и 10 дней (б) после воздействия многолучевой гидродинамической ударной волны без предварительной ФЛМА. Частицам  $\text{TiO}_2$  соответствует изображение 3.1,  $\text{ZrO}_2$  – 3.2. Числа соответствуют номерам экспериментов в табл.1, стрелками обозначены области локализации частиц.

самостоятельного способа внедрения наночастиц в кожу *in vivo*, а также проведено последовательное воздействие ФЛМА и ударной волны. Данные режимы позволяют достичь глубины внедрения частиц до 280 мкм (дерма) и 450 мкм (предположительно – волосяные фолликулы). Совместное использование ФЛМА и гидродинамической ударной волны позволило увеличить глубину внедрения частиц при снижении энергии импульса по сравнению с ранее полученными результатами (230 мкм в каналах [23] и 400 мкм в насечках [24] при энергии импульса 3 Дж).

Данные исследования могут быть полезны для разработки методов чрескожной доставки микро- и наноносителей и создания в дерме управляемого депо лекарственных препаратов.

Авторы выражают благодарность Г.Б.Альтшулеру и И.В.Ярославскому за сотрудничество. Исследование частично поддержано грантом Правительства Российской Федерации (14.Z50.31.0004) для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных.

- Lademann J., Weigmann H.J., Rickmeier C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., Sterry W. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Phys.*, **12**, 247 (1999).
- Попов А.П., Приезжев А.В., Lademann J., Myllyla R. *Оптич. журн.*, **73**, 67 (2006).
- Красников И.В., Сетейкин А.Ю., Попов А.П. *Оптика и спектроскопия*, **109**, 332 (2010).
- Kirillin M., Shirmanova M., Sirotkina M., Bugrova M., Khlebtsov B., Zagaynova E. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 021017 (2009).
- Sirotkina M.A., Shirmanova M.V., Bugrova M.L., Elagin V.V., Agrba P.D., Kirillin M.Yu., Kamensky V.A., Zagaynova E.V. *J. Nanopart. Res.*, **13**, 283 (2011).
- Zuyagin A.V., Zhao X., Gierden A., Sanchez W., Ross J.A., Roberts M.S. *J. Biomed. Opt.*, **13**, 064031 (2008).
- 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).
- Rattanapak T., Birchall J., Young K., Ishii M., Meglinski I., Rades T., Hook S. *J. Control. Release*, **172**, 894 (2013).
- Маттеини П., Ратто Ф., Росси Ф., Пини Р. *Квантовая электроника*, **44**, 652 (2014).
- Cai Y., Xu M., Yuan M., Liu Z., Yuan W. *Int. J. Nanomed.*, **9**, 3527 (2014).
- Subongkot T., Pamornpathomkul B., Rojanarata T., Opanasopit P., Ngawhirunpat T. *Int. J. Nanomed.*, **9**, 3539 (2014).
- Cevc G., Vierl U. *J. Control. Release*, **141**, 277 (2010).
- Lauer A.C., Ramachandran C., Lieb L.M., Niemiec S., Weiner N.D. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **18**, 311 (1996).
- Toll R., Jacobi U., Richter H., Lademann J., Schaefer H., Blume-Peytavi U. *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 168 (2004).
- Lademann J., Patzelt A., Richter H., Antoniou C., Sterry W., Knorr F. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 021014 (2009).
- Denet A.R., Vanbever R., Preat V. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 659 (2004).
- Enfield J., O'Connell M.-L., Lawlor K., Jonathan E., O'Mahony C., Leahy M. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 046001 (2010).
- Bachhav Y.G., Summer S., Heinrich A., Bragagna T., Böhler C., Kalia Y.N. *J. Control. Release*, **146**, 31 (2010).
- Altshuler G.B., Yaroslavsky I.V., Tabatadze D., Belikov A.V., Dierickx C.C., Genina E.A., Dolotov L.E., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. *Lasers Surg. Med.*, **42** (Suppl. 22), 4 (2010).
- Lademann J., Weigmann H.J., Rickmeier C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., Sterry W. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Phys.*, **12**, 247 (1999).
- Toll R., Jacobi U., Richter H., Lademann J., Schaefer H., Blume-Peytavi U. *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 168 (2004).
- Rolland A., Wagner N., Chatelus A., Shroot B., Schaefer H. *Pharm. Res.*, **10**, 1738 (1993).
- Genina E.A., Bashkatov A.N., Dolotov L.E., Maslyakova G.N., Kochubey V.I., Yaroslavsky I.V., Altshuler G.B., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **18**, 111406 (2013).
- 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).
- 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. *Квантовая электроника*, **42**, 471 (2012).
- Lin C.-H., Aljuffali I.A., Fang J.-Y. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11**, 599 (2014).
- Aljuffali I.A., Lin C.-H., Fang J.-Y. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **24**, 277 (2014).
- Jang H.-J., Hur E., Kim Y., Lee S.-H., Kang N.G., Yoh J.J. *J. Biomed. Opt.*, **19**, 118002 (2014).
- Chang H.-C., Lin Y.-H., Huang K.-C. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **8**, 1550029 (2015).
- Rodriguez-Menocal L., Salgado M., Davis S., Waibel J., Shabbir A., Cox A., Badiavas E.V. *PLoS ONE*, **9**, e93004 (2014).
- Belikov A.V., Skrypnik A.V., Shatilova K.V., Tuchin V.V. *Lasers Surg. Med.*, **47**, 723 (2015).
- Carniol P.J., Harirchian S., Kelly E. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.*, **19**, 247 (2011).
- Prignano F., Bonciani D., Campolmi P., Cannarozzo G., Bonan P., Lotti T. *J. Cosmet. Dermatol.*, **10**, 210 (2011).
- Laubach H.-J., Tannous Z., Anderson R.R., Manstein D. *Lasers Surg. Med.*, **38**, 142 (2006).
- Volkova E.K., Yanina I.Yu., Genina E.A., Dolotov L.E., Bashkatov A.N., Genin V.D., Konyukhova J.G., Popov A.P., Kozintseva M.D., Speranskaya E., Lomova M., Terentyuk G.S., Bucharskaya A.B., Navolokin N.A., Goryacheva I. Yu., Kochubey V.I., Gorin D.A., Tuchin V.V., Sukhorukov G.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **9537**, 95371P (2015).
- [http://www.cir-safety.org/sites/default/files/Alumin\\_032013.pdf](http://www.cir-safety.org/sites/default/files/Alumin_032013.pdf) (2013).
- Manicone P.F., Rossi I.P., Raffaelli L., Paolantonio M., Rossi G., Berardi D., Perfetti G. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **20** (Suppl 1), 9 (2007).
- Shan J.G., Zhang B., Song K.G. *J. Harbin Med. Univ.*, **3**, 008 (2006).
- Palik E.D. *Handbook of Optical Constants of Solids* (Orlando: Acad. Press, 1985).
- <http://www.filmetrics.com/refractive-index-database/ZrO2/Zirconium-Dioxide> (2016).
- Bakhr L.P., Levashenko G.I., Tamanovich V.V. *J. Appl. Spectrosc.*, **26** (3), 378 (1977).
- Bituykov V.K., Petrov V.A. *Appl. Phys. Res.*, **5** (1), 51 (2013).
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/634662?lang=en&region=RU> (2016).
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/230693?lang=en&region=RU> (2016).
- Benenson W., Harris J.W., Stocker H., Lutz H. *Handbook of Physics* (New York: Springer-Verlag, 2002).
- Физические величины: Справочник. Под ред. И.С.Григорьева, Е.З.Мейлихова (М.: Энергоатомиздат, 1991).
- Таблицы физических величин. Под ред. И.К.Кикоина (М.: Атомиздат, 1976).
- <http://refractiveindex.info/?shelf=main&book=TiO2&page=Devore-o> (2016).
- <http://refractiveindex.info/?shelf=main&book=ZrO2&page=Wood> (2016).
- <http://refractiveindex.info/?shelf=main&book=Al2O3&page=Malitson-o> (2016).
- Thrane L., Yura H.T., Andersen P.E. *J. Opt. Soc. Am. A*, **17** (3), 484 (2000).
- Тучин В.В. *Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике* (М.: Физматлит, 2012).
- Schaefer H., Redelmeier T.E. *Skin Barrier* (Basel: Karger, 1996).
- Fang J.Y., Lee W.R., Shen S.C., Wang H.Y., Fang C.L., Hu C.H. *J. Control. Release*, **100**, 75 (2004).