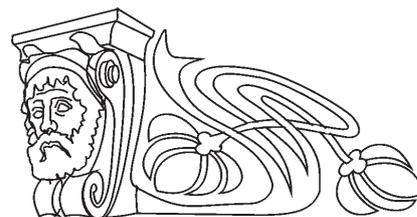




УДК 535:53.06

ОПТИЧЕСКОЕ ПРОСВЕТЛЕНИЕ КАК СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ ГЛУБИНЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ В КОЖЕ ПРИ ОКТ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ



С. М. Зайцев, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина

Зайцев Сергей Михайлович, студент-магистрант кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, sergey.zaycev.1995@bk.ru

Башкатов Алексей Николаевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники, заведующий лабораторией биомедицинской оптики Научно-образовательного института оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории биофотоники, Томский национальный исследовательский государственный университет, a.n.bashkatov@mail.ru

Тучин Валерий Викторович, доктор физико-математических наук, заведующий кафедрой оптики и биофотоники, директор Научно-образовательного института оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; научный руководитель междисциплинарной лаборатории биофотоники, Томский национальный исследовательский государственный университет; заведующий лабораторией лазерной диагностики технических и живых систем, Институт проблем точной механики и управления РАН (Саратов), tuchinvv@mail.ru

Генина Элина Алексеевна, доктор физико-математических наук, доцент кафедры оптики и биофотоники, старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской оптики Научно-образовательного института оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории биофотоники, Томский национальный исследовательский государственный университет, eagenina@yandex.ru

Наночастицы диоксида титана в настоящее время широко используются как для создания солнцезащитных фильтров, так и в качестве носителей лекарственных препаратов. Одним из путей трансэпидермальной доставки данных наночастиц в дерму кожи является их проникновение по волосным фолликулам. Однако оптический контроль заполнения фолликулов наночастицами достаточно затруднен из-за сильного светорассеяния в коже. Таким образом, целью работы является исследование возможности увеличения оптической глубины детектирования наночастиц в волосном фолликуле с помощью оптической когерентной томографии при оптическом просветлении кожи. В работе использовался оптический когерентный томограф для визуализации наночастиц диоксида титана диаметром ~25 нм, локализованных в волосных фолликулах лабораторных крыс *ex vivo* и *in vivo*. Для внедрения наночастиц в фолликулы использовался ультразвуковой фрез с частотой 1 МГц, мощностью 1 Вт и

временем облучения от 1 до 8 мин. Для увеличения оптической глубины детектирования частиц на поверхность кожи наносились иммерсионные агенты: полиэтиленгликоль (ПЭГ-400) или смесь ПЭГ-400 и диметилсульфоксида (ДМСО) в соотношении 80 и 20%, соответственно. Показано, что при использовании смеси ПЭГ-400 и ДМСО глубина детектирования увеличилась в среднем в 2.8 раз, в то время как при использовании только ПЭГ-400 глубина детектирования частиц увеличилась менее чем на 20%. Таким образом, использование оптических просветляющих агентов позволило увеличить оптическую глубину детектирования наночастиц в волосных фолликулах, при этом наибольшую эффективность продемонстрировала смесь ПЭГ-400 и ДМСО.

Ключевые слова: оптическая когерентная томография, оптическая глубина детектирования, наночастицы, оптическое просветление, оптические просветляющие агенты, фолликулы.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2018-18-4-275-284>

Введение

Ранее было установлено, что наночастицы, нанесенные на поверхность кожи, могут проникать в более глубокие слои. Наночастицы, входящие в состав косметических средств, таких как, например, солнцезащитные препараты, накапливаются в основном в эпидермисе и используются в качестве солнцезащитных фильтров [1]. Естественными путями проникновения частиц в дерму являются волосные фолликулы [2–4]. В частности, в работе [4] показано, что наночастицы диоксида титана (TiO_2) с диаметром порядка 30 нм способны проникать не только в поверхностные слои кожи, но также могут быть обнаружены и в глубине волосных фолликулов.

Окруженные густой сетью капилляров, волосные фолликулы являются перспективными объектами для использования и в качестве депо лекарственных и косметических препаратов [2, 3, 5]. Кроме того, как показано в работе [2], препарат, помещенный в наноконтейнеры, более эффективно проникает в волосные фолликулы, чем тот же препарат в жидкой форме. Для увеличения глубины проникновения лекарственных препаратов и наночастиц в кожу успешно используется ультразвук (УЗ) частотного диапазона 20 кГц – 3 МГц [6, 7], действие которого основано на эффекте кавитации.



Оптическая когерентная томография (ОКТ) широко используется для визуализации распределения частиц в биологических тканях [8–12]. Однако сильное рассеяние биотканей снижает контраст и разрешение ОКТ изображений. Простым и удобным методом повышения глубины детектирования и улучшения визуализации неоднородностей в биотканях, в том числе областей локализации частиц, с помощью ОКТ является оптическое просветление биоткани [7, 13, 14]. Иммерсионное оптическое просветление основано на снижении рассеяния биоткани за счёт согласования показателей преломления её компонентов при введении во внутритканевое пространство биосовместимых жидкостей с достаточно высоким показателем преломления [14–16]. В работе [17] показана высокая эффективность использования полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 300 и 400 Да в качестве иммерсионного агента. Однако в упомянутой работе результаты получены для образцов кожи *in vitro* в режиме коллимированного пропускания, что требует удаления образцов из организма. Таким образом, полученные результаты могут существенно отличаться от результатов исследования интактной кожи *ex vivo* и *in vivo*. В сочетании с ПЭГ и другими иммерсионными агентами достаточно часто применяется диметилсульфоксид (ДМСО) [18–20]. Его роль заключается в усилении проницаемости рогового слоя эпидермиса за счёт растворения липидов данного слоя, что способствует более эффективному проникновению оптических просветляющих агентов в глубь кожи. Использование оптического просветления с помощью комбинации ПЭГ и ДМСО при неинвазивном ОКТ сканировании кожи позволит впервые визуализировать фолликулы, заполненные микро- и наночастицами и исследовать возможность увеличения оптической глубины их детектирования, что является целью данной работы.

1. Методы и материалы

1.1. Суспензии наночастиц

В качестве исследуемых частиц использовались наночастицы диоксида титана (TiO_2) (Sigma-Aldrich, США) диаметром ~ 25 нм. На длине волны 930 нм показатель преломления частиц составляет 2.49 [11].

В качестве основы для приготовления суспензии исследуемых частиц использовались ПЭГ-300 с молекулярным весом 300 Да (Sigma-Aldrich, США), ПЭГ-400 с молекулярным весом

400 Да (Sigma-Aldrich, США) и смесь ПЭГ-400 и ДМСО (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 80 и 20% соответственно. Значения показателей преломления жидкостей на длине волны 930 нм составили 1.4559 (ПЭГ-300), 1.4581 (ПЭГ-400) [16] и 1.460 (ПЭГ-400 + ДМСО). Концентрация наночастиц во всех суспензиях составила 0.5 г/мл.

1.2. Подготовка объекта исследования

В работе использовались лабораторные крысы альбиносы *ex vivo* и *in vivo* весом 250–300 г. Перед началом исследования с поверхности тела крыс с помощью крема-депилятора «Veet» (Reckitt Benckiser, Франция) тщательно удалялся волосяной покров. На каждом животном выделялись по два участка – экспериментальный и контрольный. Диаметр участков составлял приблизительно 3 см.

В исследованиях *in vivo* крысы были предварительно анестезированы раствором Zoletil 50 (Virbac, Франция) дозой 0.05 мг/кг.

Проводимые экспериментальные исследования были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» (протокол № 8 от 10.04.2018 г.).

1.3. Исследование оптической глубины детектирования наночастиц *ex vivo*

В данном эксперименте были использованы три лабораторные крысы *ex vivo*. Подготовленная суспензия TiO_2 на основе ПЭГ-300 наносилась на поверхность кожи крысы и обрабатывалась непрерывным УЗ излучением частотой 1 МГц, мощностью 1 Вт в течение 1 минуты с помощью УЗ устройства Dinatron 125 (Dinatronics, США). Затем проводилось ОКТ-сканирование обрабатываемого участка, и процедура повторялась. Общая продолжительность УЗ обработки составляла 8 минут. Перед сканированием суспензия тщательно удалялась для предотвращения потери интенсивности ОКТ-сигнала из глубины кожи за счёт повышения отражения зондирующего излучения от поверхности.

1.4. Исследование оптической глубины детектирования наночастиц *in vivo*

В эксперименте использовались две лабораторные крысы *in vivo*. Суспензия TiO_2 на основе ПЭГ-300 наносилась на экспериментальные участки кожи крысы, которые подвергались воздействию УЗ в аналогичном режиме два раза в течение 2 минут. ОКТ-мониторинг экспериментального участка проводился до нанесения частиц, а также между УЗ облучениями и после окончания облучения.



1.5. Исследование увеличения оптической глубины детектирования наночастиц *ex vivo* с помощью оптического просветления кожи

В данном эксперименте использовались пять лабораторных крыс *ex vivo*. В качестве иммерсионных агентов использовались ПЭГ-400 и смесь ПЭГ-400 и ДМСО. На экспериментальные участки кожи крыс наносилась суспензия частиц на основе ПЭГ-400 или смеси ПЭГ-400 и ДМСО и подвергалась воздействию УЗ в течение 1 минуты. Затем суспензия удалялась, и на область воздействия наносился соответствующий иммерсионный агент. С помощью ОКТ проводился мониторинг изменения оптической глубины детектирования участков локализации наночастиц в фолликулах в течение 1 часа с интервалом 5 минут. На контрольные участки кожи наносился только иммерсионный агент.

1.6. Методика определения оптической глубины детектирования наночастиц

Для визуализации областей локализации наночастиц в фолликулах использовался спектральный оптический когерентный томограф Thorlabs OCP930SR (Thorlabs, США) с центральной длиной волны излучения 930 нм, шириной спектра излучения на полувысоте 100 нм, продольным разрешением 6.2 мкм, поперечным разрешением 9.6 мкм на воздухе и длиной области сканирования 2 мм.

Методика определения оптической глубины детектирования участков локализации наночастиц представлена в работе [21], а также проиллюстрирована на рис. 1. На рис. 1, *a* и 1, *б* представлены ОКТ-изображения участков кожи с фолликулами. На рис. 1, *a* незаполненный фолликул выглядит

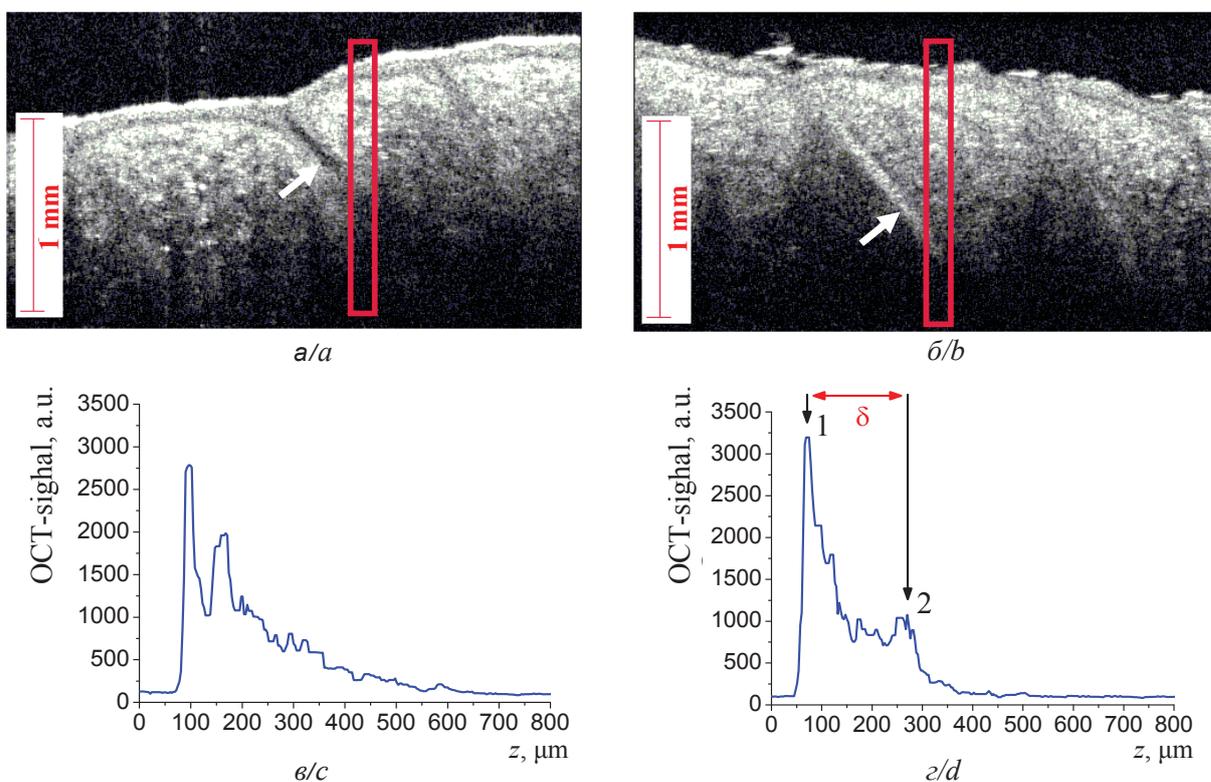


Рис. 1. ОКТ-изображение участка кожи: *a* – с фолликулом (прямоугольником обозначена исследуемая область, включающая в себя незаполненный волосной фолликул); *б* – с фолликулом, заполненным суспензией наночастиц TiO_2 (прямоугольником обозначена исследуемая область, включающая в себя нижнюю видимую часть волосного фолликула, стрелками обозначены изображения фолликулов). Зависимость интенсивности ОКТ-сигнала от глубины, усреднённой по исследуемой области, отмеченной на рис. 1, *a* (*в*) и рис. 1, *б* (*г*): 1 соответствует пику от поверхности кожи, 2 соответствует пику от суспензии наночастиц, локализованной внутри фолликула, δ – оптическая глубина детектирования частиц

Fig. 1. OCT image of a skin area: (*a*) with a follicle (a rectangle indicates the examined area including an unfilled hair follicle) and (*b*) with a follicle filled with a TiO_2 nanoparticle suspension (the rectangle indicates the examined area including the lower visible part of the hair follicle, the arrows show the follicle images). Dependence of the intensity of the OCT signal on the depth averaged over the studied area marked in fig. 1, *a* (*c*) and fig. 1, *b* (*d*): 1 corresponds to the peak from the skin surface, 2 corresponds to the peak from the nanoparticle suspension localized inside the follicle, δ is the optical depth of particles detection



как наклонный затемнённый объект с меньшей интенсивностью ОКТ-сигнала по отношению к окружающей ткани и малым контрастом визуализации (отмечен стрелкой). При заполнении фолликулов суспензией наночастиц контраст их визуализации значительно увеличивается как за счёт высокой отражательной способности наночастиц TiO_2 , так и за счёт более высоких значений показателя преломления используемых суспензий наночастиц по сравнению с показателем преломления дермы (~ 1.4 [22]). На рис. 1, б фолликул выглядит как яркое белое образование (отмечен стрелкой). На рис. 1, в и 1, г показаны А-сканы, усреднённые по выделенным участкам на рис. 1, а и 1, б. Наиболее высокий пик соответствует сигналу, отражённому от поверхности кожи. Интенсивность ОКТ-сигнала в целом снижается с увеличением глубины проникновения света в ткань в соответствии с функцией $\exp(-\mu_t z)$, где μ_t – коэффициент ослабления, z – глубина проникновения света в ткань [23]. Участки с меньшим рассеянием выглядят как провалы на графике, а локальная рассеивающая неоднородность соответствует пику (см. рис. 1, г).

Оптическая глубина (δ) детектирования наночастиц внутри фолликула определялась как расстояние между максимумами интенсивности ОКТ-сигнала от поверхности кожи и от наиболее глубоко залегающего контрастного объекта в фолликуле.

Значения оптической глубины детектирования наночастиц во всех визуализируемых фолликулах усреднялись по группе, и рассчитывалось среднеквадратичное отклонение.

2. Результаты

На рис. 2 представлена зависимость оптической глубины детектирования наночастиц в фолликулах от времени сонофореза. Хорошо видно, что с увеличением времени УЗ облучения глубина проникновения наночастиц в глубь фолликулов увеличивается. Значительный разброс значений относительно среднего в каждый момент времени объясняется, на наш взгляд, различиями стадий развития волос на исследуемых участках у различных животных, при которых глубина залегания луковицы в коже значительно варьируется [5]. Максимальная оптическая глубина проникновения данных частиц составила 197 ± 47 мкм в течение 5 мин. В дальнейшем наблюдались незначительные колебания относительно данного

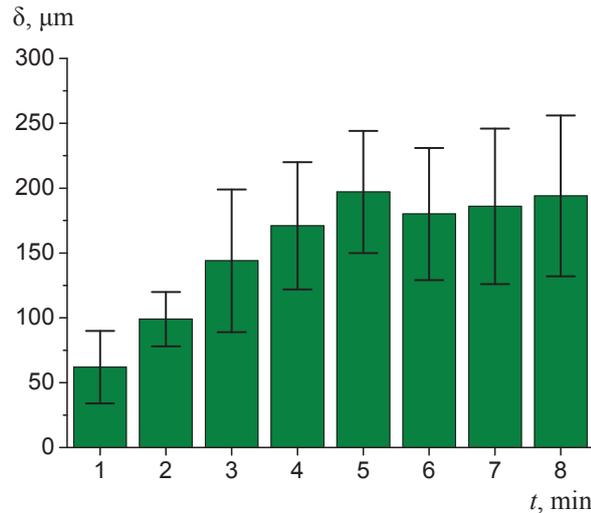


Рис. 2. Зависимость оптической глубины детектирования (δ) частиц TiO_2 в волосяных фолликулах крысы *ex vivo* от времени воздействия ультразвука

Fig. 2. Temporal dependence of the optical depth of detection (δ) of TiO_2 particles in rat hair follicles *ex vivo* on ultrasound exposure

значения, связанные с тем, что регистрация ОКТ-изображений производилась от различных участков в пределах области воздействия.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными работ [7, 10, 11, 18, 24–26], в которых показано, что воздействие УЗ с частотой 1–1.5 МГц способствует более глубокому внедрению лекарственных препаратов и наночастиц в биоткани. Для объяснения повышения проницаемости кожи под действием УЗ с различной частотой Polat с соавт. [24] предложили несколько кавитационных механизмов. Так, при частоте >0.7 МГц микропузырьки образуются внутри кожи в волосяных фолликулах и полостях слюнных желёз, при этом радиус пузырька составляет <2.7 мкм. Разница давления при осцилляции пузырьков способствует проталкиванию суспензии наночастиц в фолликул. Использование более низкочастотного ультразвука вызывает усиленный кавитационный эффект, который приводит к разрушению микропузырьков, что усиливает движение окружающей жидкости, но может вызвать повреждение ткани. Кроме того, в процессе облучения на низких частотах наблюдается нагрев ткани, что также улучшает её проницаемость [6].

На рис. 3 представлены сравнительные ОКТ-изображения исследуемых участков кожи *in vivo* до внедрения частиц, после нанесения суспензии TiO_2 на основе ПЭГ-300 и УЗ обработки исследуемого участка (2 мин), а также после вторичного нанесения суспензии и повторной обработки

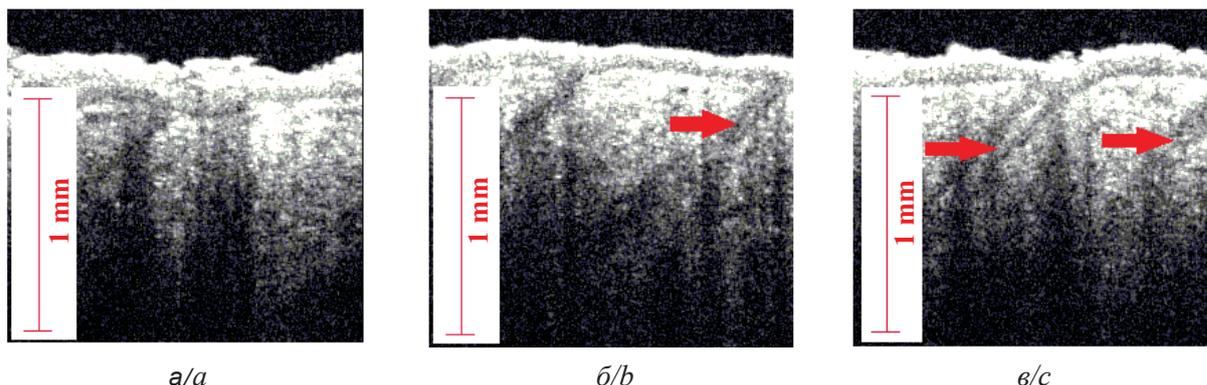


Рис. 3. ОКТ-изображения исследуемых участков кожи *in vivo* с фолликулами: а – до внедрения суспензии наночастиц TiO_2 ; б – после нанесения суспензии и двухминутного УЗ воздействия; в – после повторного нанесения суспензии и двухминутного УЗ воздействия. Стрелками обозначены участки, соответствующие волосным фолликулам с локализованными внутри исследуемыми частицами

Fig. 3. OCT images of the examined skin areas *in vivo* with follicles: (a) prior to the introduction of the suspension of TiO_2 nanoparticles; (b) after application of the suspension and a two-minute ultrasonic exposure; (c) after repeated application of the suspension and a two-minute ultrasonic exposure. The arrows indicate the areas corresponding to the hair follicles with the particles localized inside

исследуемого участка (2 мин). Таким образом, полное время облучения составляло 4 мин. На рисунке отчетливо видны фолликулы, заполненные суспензией частиц (отмечены стрелками).

Анализ изображений показал, что средняя оптическая глубина детектирования частиц после двухминутного воздействия УЗ составила 57 ± 9 мкм, а после четырёхминутного – 99 ± 9 мкм.

Сравнение оптической глубины детектирования наночастиц в коже с предыдущим экспериментом показало, что в *in vivo* исследованиях значения данного параметра приблизительно в 1.7 раза меньше, чем при аналогичном воздействии в *ex vivo* исследованиях. Результаты оценки представлены на рис. 4. Данный результат может быть связан с небольшим оптическим просветлением кожи основой суспензии (ПЭГ-300), возникающем уже в процессе УЗ воздействия. Оптическое просветление способствует увеличению глубины зондирования ОКТ [14], что позволяет визуализировать более глубокие участки фолликулов. При *ex vivo* исследованиях оптическое просветление более эффективно, так как отсутствует реакция организма, направленная на вымывание иммерсионного агента из области наблюдения и восстановление биохимического состава внутриклеточной среды.

На рис. 5 представлены две серии ОКТ-изображений исследуемых участков кожи крысы *ex vivo* при использовании в качестве оптических просветляющих агентов ПЭГ-400 и смеси ПЭГ-400 и ДМСО. ПЭГ-400 был выбран на основе

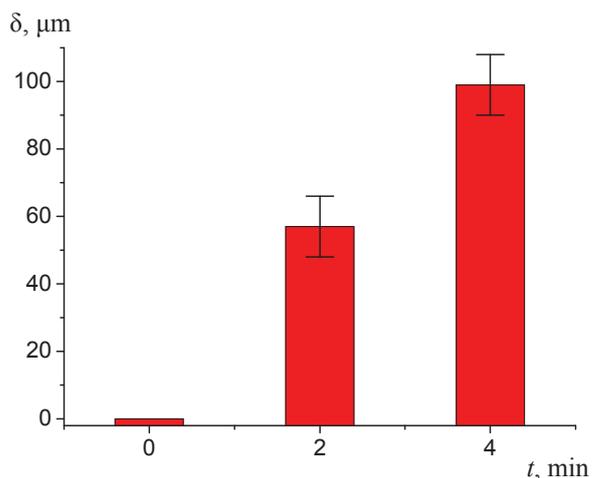


Рис. 4. Временная зависимость оптической глубины детектирования (δ) частиц TiO_2 в волосных фолликулах крысы *in vivo* под действием ультразвука

Fig. 4. Temporal dependence of the optical depth of detection (δ) of TiO_2 particles in rat hair follicles *in vivo* on ultrasound exposure

данных работы [17], в которой было показано, что ПЭГ-400 является более эффективным агентом, чем ПЭГ-300. ДМСО использовался для увеличения проницаемости рогового слоя эпидермиса [18–20]. На рис. 5, а и 5, б представлены изображения участков кожи с фолликулами до нанесения суспензии наночастиц, на рис. 5, в и 5, д – сразу после нанесения и УЗ воздействия в течение 1 мин, на рис. 5, е и рис. 5, з – через 60 мин после нанесения на обработанную область иммерсионных просветляющих агентов.

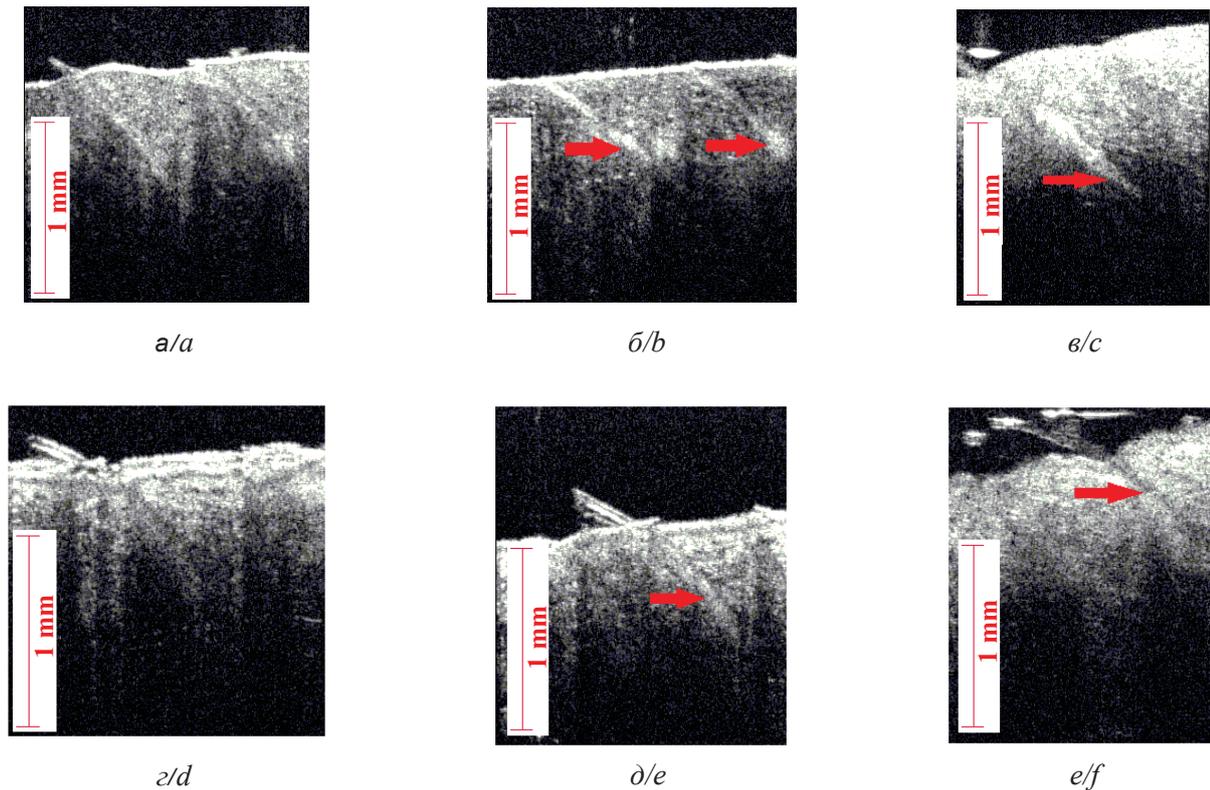


Рис. 5. ОКТ-изображения исследуемых участков кожи крысы *ex vivo* при использовании в качестве иммерсионного просветляющего агента смеси ПЭГ-400 и ДМСО (80:20%) (а, б, в): а – до внедрения суспензии наночастиц, б – после УЗ внедрения частиц в течение 1 мин, в – через 60 мин после нанесения агента; и при использовании в качестве иммерсионного просветляющего агента ПЭГ-400 (г, д, е): г – до внедрения суспензии наночастиц, д – после УЗ внедрения частиц в течение 1 мин, е – через 60 мин после нанесения агента. Стрелками обозначены участки, соответствующие волосяным фолликулам с локализованными внутри исследуемыми частицами

Fig. 5. OCT images of the examined rat skin areas *ex vivo* using the mixture of PEG-400 and DMSO (80:20%) as an immersion clearing agent (a, b, c): (a) prior to the introduction of the nanoparticle suspension, (b) after ultrasonic penetration of the particles for 1 min, (c) 60 minutes after the application of the agent; and when PEG-400 is used as an immersion clearing agent (d, e, f): (d) prior to the penetration of the nanoparticle suspension, (e) after ultrasonic penetration of the particles for 1 minute, (f) 60 minutes after the application of the agent. The arrows indicate the areas corresponding to the hair follicles with the particles localized inside

На рис. 6 показаны средние значения оптической глубины детектирования частиц, измеренные в различные моменты времени. Значение глубины детектирования в начальный момент соответствует измерению непосредственно после внедрения наночастиц до нанесения иммерсионного агента. Сравнение рис. 2 и рис. 6 показывает, что использование ПЭГ-400 в качестве основы для приготовления суспензии наночастиц способствует визуализации наночастиц на большей глубине после минутного УЗ воздействия (в среднем для обеих групп более 130 мкм), чем ПЭГ-300 (62 ± 28 мкм), что может быть связано с более эффективным оптическим просветлением кожи уже в течение УЗ обработки. С течением времени воздействие двухкомпонентного иммерсионного агента (ПЭГ-400 и ДМСО) приводит к дальнейшему увеличению

глубины зондирования, вследствие чего увеличивается и оптическая глубина детектирования частиц, локализованных в волосяных фолликулах. Среднее значение δ при использовании смеси ПЭГ-400 и ДМСО увеличилось в течение 60 мин с 120 ± 80 до 335 ± 47 мкм, т.е. в 2.8 раз.

Кинетика средней оптической глубины детектирования наночастиц при оптическом просветлении ткани с помощью ПЭГ-400 говорит о том, что использование ПЭГ-400 без добавления ДМСО в течение всего времени наблюдения не способствует дополнительному увеличению оптической глубины детектирования наночастиц. Частицы хорошо визуализировались на глубине ≤ 200 мкм, что менее чем на 20% больше оптической глубины детектирования без оптического просветления кожи.

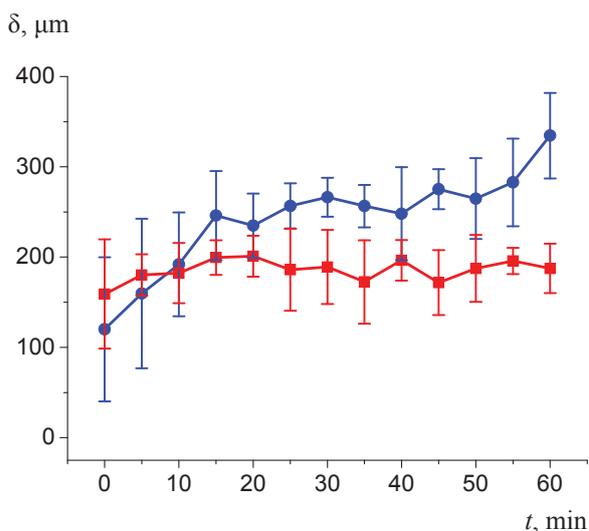


Рис. 6. Кинетика средней оптической глубины детектирования наночастиц TiO_2 в волосяных фолликулах крысы *ex vivo* при оптическом просветлении ткани с помощью ПЭГ-400 (■) и с помощью смеси ПЭГ-400 и ДМСО (80:20%) (●). Символы соответствуют экспериментальным данным, вертикальные линии – среднее квадратическому отклонению

Fig. 6. Kinetics of the average optical depth of detection of TiO_2 nanoparticles in rat hair follicles *ex vivo* during optical tissue clearing with PEG-400 (■) and with a mixture of PEG-400 and DMSO (80:20%) (●). The symbols correspond to the experimental data, the vertical lines correspond to the standard deviation

Влияние ДМСО на скорость и величину оптического просветления объясняется его способностью растворять липиды рогового слоя эпидермиса [27] и изменять межфибрилярное пространство коллагеновых волокон на субмикронном уровне [28].

Таким образом, результаты данного исследования показали, что применение двухкомпонентного иммерсионного агента (ПЭГ-400 и ДМСО) способствует лучшей визуализации объектов внутри ткани, по сравнению с ПЭГ-400, несмотря на близкие значения показателей преломления обоих препаратов. Также можно сделать вывод о том, что воздействия сонофореза в течение одной минуты достаточно для достижения максимальной глубины проникновения наночастиц в фолликулы.

Заключение

В результате эксперимента по исследованию внедрения наночастиц TiO_2 диаметром ~ 25 нм в кожу по каналу волосяного фолликула получено, что при использовании сонофореза с частотой 1 МГц и мощностью облучения 1 Вт в течение

1 мин фолликулы полностью заполняются суспензией наночастиц, однако для детектирования оптической глубины их локализации в фолликуле с помощью ОКТ необходимо дополнительно применять оптическое иммерсионное просветление кожи. При использовании в качестве иммерсионного агента смесь ПЭГ-400 и ДМСО (в соотношении 80:20%) получено, что оптическая глубина детектирования частиц в фолликулах увеличилась в течение 60 мин в 2.8 раз. В контрольном эксперименте с применением только ПЭГ-400 максимальная глубина детектирования наночастиц увеличилась только на 20%. Таким образом, добавление ДМСО способствует дополнительному увеличению средней глубины детектирования наночастиц в коже.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-73-20172).

Список литературы

1. Popov A. P., Zvyagin A. V., Lademann J., Roberts M. S., Sanchez W., Priezhev A. V., Myllyla R. Designing inorganic light-protective skin nanotechnology products // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2010. Vol. 6, № 5. P. 432–451. DOI: 10.1166/jbn.2010.1144
2. 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. Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles // *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2007. Vol. 66, iss. 2. P. 159–164. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.10.019
3. Jung S., Patzelt A., Otberg N., Thiede G., Sterry W., Lademann J. Strategy of topical vaccination with nanoparticles // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, iss. 2. P. 021001. DOI: 10.1117/1.3080714
4. Lademann J., Knorr F., Richter H., Jung S., Meinke M. C., Rühl E., Alexiev U., Calderon M., Patzelt A. Hair follicles as a target structure for nanoparticles // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2015. Vol. 8, № 4. P. 1530004. DOI: 10.1142/S1793545815300049
5. Самусев П. П., Липченко В. Я. Атлас анатомии человека. М. : Оникс 21 век ; Мир и образование, 2002. 544 с.
6. Azagury A., Khoury L., Enden G., Kost J. Ultrasound mediated transdermal drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014. Vol. 72. P. 127–143. DOI: 10.1016/j.addr.2014.01.007
7. Volkova E. K., Yanina I. Y., Genina E. A., Bashkatov A. N., Konyukhova J. G., Popov A. P., Speranskaya E. S., Bucharskaya A. B., Navolokin N. A., Goryacheva I. Y., Kochubey V. I., Sukhorukov G. B., Meglinski I. V., Tuchin V. V. Delivery and reveal of localization of upconversion luminescent microparticles and quantum dots in the skin



- in vivo* by fractional laser microablation, multimodal imaging, and optical clearing // *J. Biomed. Opt.* 2018. Vol. 23, iss. 2. P. 026001-1–026001-11. DOI: 10.1117/1.JBO.23.2.026001
8. Zagaynova E. V., Shirmanova M. V., Kirillin M. Y., Khlebtsov B. N., Orlova A. G., Balalaeva I. V., Sirotkina M. A., Bugrova M. L., Agrba P. D., Kamensky V. A. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography : phantom, *in vivo* studies and Monte Carlo simulation // *Phys. Med. Biol.* 2008. Vol. 53, № 18. P. 4995–5009. DOI: 10.1088/0031-9155/53/18/010
 9. Sirotkina M. A., Shirmanova M. V., Bugrova M. L., Elagin V. V., Agrba P. A., Kirillin M. Yu., Kamensky V. A., Zagaynova E. V. Continuous optical coherence tomography monitoring of nanoparticles accumulation in biological tissues // *J. Nanoparticle Res.* 2011. Vol. 13, iss. 1. P. 283–291. DOI: 10.1007/s11051-010-0028-x
 10. Генина Э. А., Киндер С. А., Башкатов А. Н., Тучин В. В. Контрастирование изображений в оптической когерентной томографии печени с помощью наночастиц // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика.* 2011. Т. 11, вып. 2. С. 10–14.
 11. Genina E. A., Dolotov L. E., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Fractional laser microablation of skin : increasing the efficiency of transcutaneous delivery of particles // *Quantum Electronics.* 2016. Vol. 46, № 6. P. 502–509. DOI: 10.1070/QEL16109
 12. Genina E. A., Svenskaya Yu. I., Yanina I. Yu., Dolotov L. E., Navolokin N. A., Bashkatov A. N., Terentyuk G. S., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N., Gorin D. A., Tuchin V. V., Sukhorukov G. B. Optical monitoring of transcutaneous of composite microparticles *in vivo* // *Biomedical Optics Express.* 2016. Vol. 7, iss. 6. P. 2082–2087. DOI: 10.1364/BOE.7.002082
 13. Wen X., Jacques S. L., Tuchin V. V., Zhu D. Enhanced optical clearing of skin *in vivo* and optical coherence tomography in-depth imaging // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, iss. 6. P. 066022. DOI: 10.1117/1.JBO.17.6.066022
 14. Larin K. V., Ghosn M. G., Bashkatov A. N., Genina E. A., Trunina N. A., Tuchin V. V. Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 2012. Vol. 18, № 3. P. 1244–1259. DOI: 10.1109/JSTQE.2011.2181991
 15. Zhu D., Larin K. V., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing // *Laser & Photonics Reviews.* 2013. Vol. 7, iss. 5. P. 732–757. DOI: 10.1002/lpor.201200056
 16. Genina E. A., Bashkatov A. N., Sinichkin Yu. P., Yanina I. Yu., Tuchin V. V. Optical clearing of biological tissues : prospects of application in medical diagnostics and phototherapy // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering.* 2015. Vol. 1, № 1. P. 22–58. DOI: 10.18287/jbpe-2015-1-1-22
 17. Tuchina D. K., Genin V. D., Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Optical clearing of skin tissue *ex vivo* with Polyethylene Glycol // *Optics and Spectroscopy.* 2016. Vol. 120, iss. 1. P. 28–37. DOI: 10.1134/S0030400X16010215
 18. Генина Э. А., Терентюк Г. С., Башкатов А. Н., Михеева Н. А., Колесникова Е. А., Баско М. В., Хлебцов Б. Н., Хлебцов Н. Г., Тучин В. В. Сравнительное исследование физического, химического и мультимодального подходов к усилению транспорта наночастиц в коже с модельным дерматитом // *Российские нанотехнологии.* 2014. Т. 9, № 9–10. С. 87–96.
 19. Genina E. A., Bashkatov A. N., Kolesnikova E. A., Basco 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. Vol. 19, iss. 2. P. 021109. DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.021109
 20. Jiang J., Boese M., Turner P., Wang R. K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, iss. 2. P. 021105. DOI: 10.1117/1.2899153
 21. 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. 478–483. DOI: 10.1070/QE2012v042n06ABEH014884
 22. Tuchin V. V. *Tissue optics : Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis.* 3rd ed. Bellingham, WA, USA : SPIE Press, 2015. Vol. PM254. 934 p. (SPIE Tutorial Text in Optical Engineering).
 23. Wang R. K., Tuchin V. V. *Optical Coherence Tomography : Light Scattering and Imaging Enhancement // Handbook of Coherent-Domain Optical Methods / ed. V. Tuchin.* N.Y. : Springer, 2013. P. 665–742. DOI: 10.1007/978-1-4614-5176-1_16
 24. Polat B. E., Hart D., Langer R., Blankschtein D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery : mechanisms, scope, and emerging trends // *J. Controlled Release.* 2011. Vol. 152, iss. 3. P. 330–348. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.006
 25. 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. Vol. 15, iss. 3. P. 036012. DOI: 10.1117/1.3432750
 26. Xu X., Zhu Q. Sonophoretic delivery for contrast and depth improvement in skin optical coherence tomography // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 2008. Vol. 14, iss. 1. P. 56–61.
 27. Zimmerley M., McClure R. A., Choi B., Potma E. O. Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy // *Appl. Opt.* 2009. Vol. 48, iss. 10. P. D79–D87. DOI: 10.1364/AO.48.000D79
 28. Funke A. P., Schiller R., Motzkus H. W., Gunther C., Muller R. H., Lipp R. Transdermal delivery of highly lipophilic drugs : *in vitro* fluxes of antiestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations // *Pharm. Res.* 2002. Vol. 19, iss. 5. P. 661–668. DOI: 10.1023/A:1015314314796

**Образец для цитирования:**

Зайцев С. М., Башкатов А. Н., Тучин В. В., Генина Э. А. Оптическое просветление как способ увеличения глубины детектирования наночастиц в коже при ОКТ-визуализации // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 275–284. DOI: <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2018-18-4-275-284>

Optical Clearing as Method to Increase the Depth of Nanoparticles Detection in the Skin with OCT-Visualization

S. M. Zaytsev, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, E. A. Genina

Sergey M. Zaytsev, <https://orcid.org/0000-0002-6395-5539>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, sergey.zaycev.1995@bk.ru

Alexey N. Bashkatov, <https://orcid.org/0000-0003-3996-0001>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, a.n.bashkatov@mail.ru

Valery V. Tuchin, <https://orcid.org/0000-0001-7479-2694>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov. 410012, Russia, tuchinvv@mail.ru

Elina A. Genina, <https://orcid.org/0000-0003-3996-0002>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov. 410012, Russia, eagenina@yandex.ru

Background and Objectives: Nanoparticles of titanium dioxide are now widely used both for the creation of sunscreen filters, and as carriers of drugs. One of the ways of transepidermal delivery of these nanoparticles to the dermis of the skin is their penetration into the hair follicles. However, optical control of the filling of follicles with nanoparticles is rather difficult due to strong light scattering in the skin. Thus, the aim of the work is to investigate the possibility of increasing the optical depth of detection of nanoparticles in the hair follicle by means of optical coherence tomography in optical skin clearing. **Methods and Materials:** An optical coherent tomograph was used to visualize titanium nanoparticles with a diameter of ~ 25 nm, localized in the hair follicles of laboratory rats *ex vivo* and *in vivo*. For the introduction of nanoparticles into the follicles, ultrasonophoresis was used with a frequency of 1 MHz, a power of 1 W, and an irradiation time of 1 to 8 min. To increase the optical depth of detection of particles, immersion agents were additionally applied on the surface of the skin: PEG-400 or a mixture of PEG-400 and DMSO. **Results:** It was shown that when using a mixture of PEG-400 and DMSO, the depth of detection increased by an average of 2.8 times, while using only PEG-400, the optical depth of detection of particles increased by less than 20%. **Conclusion:** Thus, the use of optical clearing agents made it possible to increase the optical depth of detection of nanoparticles in the hair follicles, with the greatest efficiency demonstrated by a mixture of PEG-400 and DMSO.

Key words: optical coherence tomography, optical depth of detection, nanoparticles, optical clearing, optical clearing agents, follicles.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-73-20172).

References

1. Popov A. P., Zvyagin A. V., Lademann J., Roberts M. S., Sanchez W., Priezzhev A. V., Myllyla R. Designing inorganic light-protective skin nanotechnology products. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2010, vol. 6, no. 5, pp. 432–451. DOI: 10.1166/jbn.2010.1144
2. 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. Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, vol. 66, iss. 2, pp. 159–164. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.10.019
3. Jung S., Patzelt A., Otberg N., Thiede G., Sterry W., Lademann J. Strategy of topical vaccination with nanoparticles. *J. Biomed. Opt.*, 2009, vol. 14, iss. 2, pp. 021001. DOI: 10.1117/1.3080714
4. Lademann J., Knorr F., Richter H., Jung S., Meinke M. C., Rühl E., Alexiev U., Calderon M., Patzelt A. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 2015, vol. 8, no. 4, pp. 1530004. DOI: 10.1142/S1793545815300049
5. Samusev R. P., Lipchenko V. Ia. *Atlas anatomii cheloveka* [Atlas of human anatomy]. Moscow, Onyx 21 century, World and education, 2002, pp. 5–13 (in Russian).
6. Azagury A., Khoury L., Enden G., Kost J. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, vol. 72, pp. 127–143. DOI: 10.1016/j.addr.2014.01.007
7. Volkova E. K., Yanina I. Y., Genina E. A., Bashkatov A. N., Konyukhova J. G., Popov A. P., Speranskaya E. S., Bucharskaya A. B., Navolokin N. A., Goryacheva I. Y., Kochubey V. I., Sukhorukov G. B., Meglinski I. V., Tuchin V. V. Delivery and reveal of localization of upconversion luminescent microparticles and quantum dots in the skin *in vivo* by fractional laser microablation, multimodal imaging, and optical clearing. *J. Biomed. Opt.*, 2018, vol. 23, iss. 2, pp. 026001-1–026001-11. DOI: 10.1117/1.JBO.23.2.026001
8. Zagaynova E. V., Shirmanova M. V., Kirillin M. Y., Khlebtsov B. N., Orlova A. G., Balalaeva I. V., Sirotkina M. A., Bugrova M. L., Agrba P. D., Kamensky V. A. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: phantom, *in vivo* studies and Monte Carlo simulation. *Phys. Med. Biol.*, 2008, vol. 53, no. 18, pp. 4995–5009. DOI: 10.1088/0031-9155/53/18/010
9. Sirotkina M. A., Shirmanova M. V., Bugrova M. L., Elagin V. V., Agrba P. A., Kirillin M. Yu., Kamensky V. A., Zagaynova E. V. Continuous optical coherence



- tomography monitoring of nanoparticles accumulation in biological tissues. *J. Nanoparticle Res.*, 2011, vol. 13, iss. 1, pp. 283–291. DOI: 10.1007/s11051-010-0028-x
10. Genina E. A., Kinder S. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Contrasting in Optical Coherence Tomography Imaging of Liver by Nanoparticles. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Physics*, 2011, vol. 11, iss. 2, pp. 10–14 (in Russian).
 11. Genina E. A., Dolotov L. E., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Fractional laser microablation of skin: increasing the efficiency of transcutaneous delivery of particles. *Quantum Electronics*, 2016, vol. 46, no. 6, pp. 502–509. DOI: 10.1070/QEL16109
 12. Genina E. A., Svenskaya Yu. I., Yanina I. Yu., Dolotov L. E., Navolokin N. A., Bashkatov A. N., Terentyuk G. S., Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N., Gorin D. A., Tuchin V. V., Sukhorukov G. B. Optical monitoring of transcutaneous of composite microparticles *in vivo*. *Biomedical Optics Express*, 2016, vol. 7, iss. 6, pp. 2082–2087. DOI: 10.1364/BOE.7.002082
 13. Wen X., Jacques S. L., Tuchin V. V., Zhu D. Enhanced optical clearing of skin *in vivo* and optical coherence tomography in-depth imaging. *J. Biomed. Opt.*, 2012, vol. 17, iss. 6, pp. 066022. DOI: 10.1117/1.JBO.17.6.066022
 14. Larin K. V., Ghosn M. G., Bashkatov A. N., Genina E. A., Trunina N. A., Tuchin V. V. Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 1244–1259. DOI: 10.1109/JSTQE.2011.2181991
 15. Zhu D., Larin K. V., Luo Q., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, vol. 7, iss. 5, pp. 732–757. DOI: 10.1002/lpor.201200056
 16. Genina E. A., Bashkatov A. N., Sinichkin Yu. P., Yanina I. Yu., Tuchin V. V. Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy. *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*, 2015, vol. 1, no. 1, pp. 22–58. DOI: 10.18287/jbpe-2015-1-1-22
 17. Tuchina D. K., Genin V. D., Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Optical clearing of skin tissue *ex vivo* with Polyethylene Glycol. *Optics and Spectroscopy*, 2016, vol. 120, iss. 1, pp. 28–37. DOI: 10.1134/S0030400X16010215
 18. Genina E. A., Terentyuk G. S., Bashkatov A. N., Mikheeva N. A., Kolesnikova E. A., Basko M. V., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G., Tuchin V. V. Comparative study of the physical, chemical, and multimodal approaches to enhancing nanoparticle transport in the skin with model dermatitis. *Nanotechnologies in Russia*, 2014, vol. 9, no. 9–10, pp. 87–96 (in Russian).
 19. Genina E. A., Bashkatov A. N., Kolesnikova E. A., Basko 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, vol. 19, iss. 2, pp. 021109. DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.021109
 20. Jiang J., Boese M., Turner P., Wang R. K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *J. Biomed. Opt.*, 2008, vol. 13, iss. 2, pp. 021105. DOI: 10.1117/1.2899153
 21. Genina E. A., Terentyuk G. S., Bashkatov A. N., Khlebtsov B. N., Tuchin V. V. Visualisation of distribution of gold nanoparticles in liver tissues *ex vivo* and *in vitro* using the method of optical coherence tomography. *Quantum Electronics*, 2012, vol. 42, no. 6, pp. 478–483. DOI: 10.1070/QE2012v042n06ABEH014884
 22. Tuchin V. V. *Tissue optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*. 3rd ed. Bellingham, WA, USA, SPIE Press, 2015, vol. PM254. 934 p. (SPIE Tutorial Text in Optical Engineering).
 23. Wang R. K., Tuchin V. V. Optical Coherence Tomography: Light Scattering and Imaging Enhancement. In: *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods*. Ed. V. Tuchin. New York, Springer, 2013, pp. 665–742. DOI: 10.1007/978-1-4614-5176-1_16
 24. Polat B. E., Hart D., Langer R., Blankschtein D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: mechanisms, scope, and emerging trends. *J. Controlled Release*, 2011, vol. 152, iss. 3, pp. 330–348. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.006
 25. 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, vol. 15, iss. 3, pp. 036012. DOI: 10.1117/1.3432750
 26. Xu X., Zhu Q. Sonophoretic delivery for contrast and depth improvement in skin optical coherence tomography. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2008, vol. 14, iss. 1, pp. 56–61.
 27. Zimmerley M., McClure R. A., Choi B., Potma E. O. Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy. *Appl. Opt.*, 2009, vol. 48, iss. 10, pp. D79–D87. DOI: 10.1364/AO.48.000D79
 28. Funke A. P., Schiller R., Motzkus H. W., Gunther C., Muller R. H., Lipp R. Transdermal delivery of highly lipophilic drugs: *in vitro* fluxes of antiestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations. *Pharm. Res.*, 2002, vol. 19, iss. 5, pp. 661–668. DOI: 10.1023/A:1015314314796

Cite this article as:

Zaytsev S. M., Bashkatov A. N., Tuchin V. V., Genina E. A. Optical Clearing as Method to Increase the Depth of Nanoparticles Detection in the Skin with OCT-Visualization. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Physics*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 275–284 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2018-18-4-275-284>
