

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДОСТАВКИ МИКРОЧАСТИЦ В КОЖУ
ЧЕРЕЗ ВОЛОСЯНЫЕ ФОЛЛИКУЛЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 434 группы направления 03.03.02 «Физика» профиль
«Физика живых систем» физического факультета
Зайцева Сергея Михайловича

Научный руководитель
доцент, к. ф.-м.н. _____

Э. А. Генина

Заведующий кафедрой
профессор, д.ф.-м.н. _____

В. В. Тучин

Саратов 2016 год

Введение

В данной работе представлена разработка метода доставки микрочастиц в кожу через волосяные фолликулы. В результате многолетних исследований наночастиц было установлено, что они способны доставлять лекарства местного применения через кожный барьер. Успешная загрузка лекарств в наночастицы и их помещение внутрь волосяного фолликула может представлять идеальный метод для локализованной доставки лекарств. Окруженные густой сетью капилляров, волосяные фолликулы являются интересными целевыми структурами. Они также содержат стволовые клетки, которые играют важную роль в регенеративной медицине, и дендритные клетки, которые важны для иммуномодуляции. В зависимости от размера частиц, такой способ может позволить выбирать целью различные структуры, такие как стволовые клетки, или клетки иммунной системы или кровеносных сосудов, находящиеся в непосредственной близости от волосяных фолликулов [1].

В последние годы активно разрабатываются методы трансфолликулярной доставки наночастиц [1,5,10] главным образом за счёт их неинвазивности и простоты реализации. Однако важными проблемами остаются: выяснение возможной глубины проникновения частиц различных размеров и создание биodeградируемых частиц, способных к накоплению в фолликулах и постепенному и управляемому высвобождению лекарственных препаратов [7-9].

Цель работы - разработка методики внедрения частиц-носителей лекарственных препаратов в волосяные фолликулы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- экспериментальным путем выяснить глубину проникновения тестовых разноразмерных частиц в волосяные фолликулы крысы *ex vivo* и *in vivo* при стимулирующем воздействии низкочастотного УЗ.

- оптимизировать способ доставки биodeградируемых микроконтейтеров в волосяные фолликулы крысы *in vivo*.

Работа состоит из двух частей. В первой части рассматривается теоретический материал для данной работы. Один из разделов посвящён принципу работы оптического когерентного томографии (ОКТ) и применимости ОКТ для визуализации кожи. В следующем разделе рассматривается строение волоса и волосяного фолликула. В третьем разделе описывается принцип доставки частиц внутрь волосяного фолликула. Во второй части описываются проведённые в рамках данной работы *in vivo* и *ex vivo* эксперименты с частицами диоксида титана, а также *in vivo* эксперимент с частицами карбоната кальция.

Основное содержание работы

В первой части выпускной квалификационной работы рассматривается теоретический материал по данной тематике.

ОКТ – метод неинвазивного исследования тонких слоев кожи и слизистых оболочек, глазных и зубных тканей человека. Неинвазивная (т.е. неповреждающая) визуализация различных органов человека и ранняя диагностика злокачественных новообразований, а также определение оптических параметров различных биотканей являются главными преимуществами ОКТ [11].

При ОКТ излучение от источника при помощи светоделителя расщепляется и подается в предметное и опорное плечи оптического устройства, называемого интерферометром. В предметном плече свет направляется на объектив оптического сканера, который фокусирует луч на исследуемом объекте, а также осуществляет обратный ввод рассеянного исследуемым объектом излучения. В опорном плече световая волна проходит эквивалентный (по отношению к предметной волне) оптический путь по направлению к зеркалу и в обратном направлении к светоделителю.

Объединяя боковое сканирование и сканирование по глубине, ОКТ позволяет получить двумерное изображение в поперечном сечении микроструктуры ткани [2, 11].

В настоящее время ОКТ является эффективным прижизненным методом неинвазивного исследования структуры кожи, приближающимся по информативности к методу традиционной биопсии. ОКТ позволяет дифференцировать изображения здоровой и патологически измененной кожи (рисунок 4) [2-4].

Далее в работе рассматривается строение волоса и волосяного фолликула. Схема строения волосяного фолликула представлена на рисунке 1:

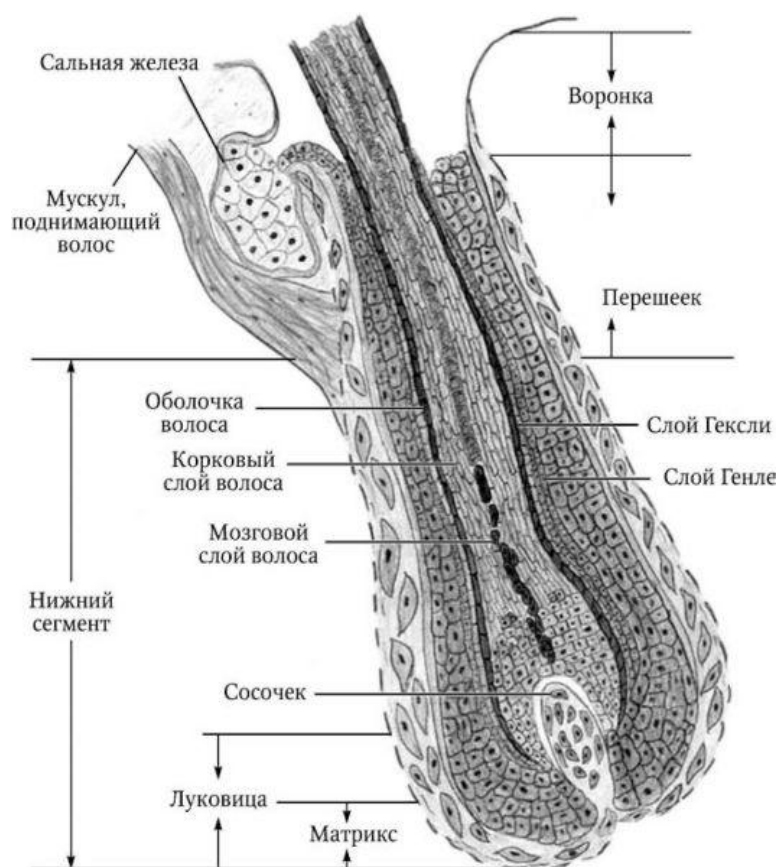


Рисунок 1 - Строение фолликула и волоса[17].

Доставка лекарств в и через кожу человека является темой интенсивных исследований в области фармакологии и косметологии. Оценка и

оптимизация лекарственных препаратов и косметических средств требует знания возможных путей проникновения. Наряду с межклеточным путём проникновения местно применяемых веществ, проходящих через кожу человека вдоль липидных слоёв вокруг корнеоцитов, важными и достаточно эффективными путями проникновения являются волосяные фолликулы[5-7].

В работах [1,8,12-14] было установлено, что наночастицы проникают в волосяные фолликулы более эффективно, чем составы, не включённые в частицы. Также оказалось, что движение волос при стимуляции УЗ-массажем действует как насос, толкающий наночастицы глубоко в волосяной фолликул.

Во второй части работы представлена экспериментальная часть. В первом разделе описываются *ex vivo* и *in vivo* эксперименты с частицами диоксида титана. Целью этих экспериментов являлось введение микро- и наночастиц в виде суспензии внутрь волосяного фолликула с помощью ультразвука и последующий анализ полученных результатов с определением зависимости оптической глубины проникновения частиц от диаметра самих частиц.

В качестве источника УЗ использовался излучатель Dinatron 125 (Dinatronics, США).

В качестве исследуемых частиц использовались частицы диоксида титана (TiO_2) производства компании Sigma-Aldrich (США) трех видов, различающихся диаметром: 25 нм, 100 нм и 5 мкм. Для лучшей диффузии частиц внутрь волосяного фолликула были приготовлены суспензии этих частиц концентрацией 0.5 г/мл. В качестве жидкой дисперсионной среды использовался полиэтиленгликоль 300 (PEG 300) производства компании Sigma-Aldrich.

В *ex vivo* эксперименте подготовленные суспензии наносились на различные, предварительно депилированные участки кожи белой лабораторной крысы и подвергались воздействию ультразвука частотой 1 МГц, мощностью 1 Вт с постоянной цикличностью в течении 1 минуты.

Затем с помощью ОКТ снималась томограмма обрабатываемого участка и процедура повторялась. Продолжительность измерений составляла 8 минут.

В *in vivo* эксперименте использовалась лабораторная крыса альбинос возрастом около 1 года весом 250-300 г, предварительно анестезированная с помощью Zoletil 50 (Virbac, Франция) дозой 0.05 мг/кг. Подготовленные суспензии наносились на различные, предварительно депилированные участки кожи крысы и подвергались воздействию ультразвука частотой 1 МГц, мощностью 1 Вт с постоянной цикличностью 2 раза в течение 2 минут. С помощью ОКТ снимались изображения поверхности кожи перед началом эксперимента, после 2 минут облучения, и в конце эксперимента после 4 минут суммарного облучения.

Для визуализации кожи использовался спектральный оптический когерентный томограф Thorlabs OCP930SR (Thorlabs, США).

На основании анализа ОКТ изображений обработанных участков кожи оценивалась оптическая глубина локализации частиц в волосяных фолликулах.

Полученные средние значения оптической глубины проникновения *ex vivo* и среднеквадратичные отклонения для частиц различных диаметров представлены в таблице 1.

Для сравнения средних значений глубины проникновения разномасштабных частиц в фолликулы кожи крысы в разные промежутки времени была построена гистограмма (рисунок 2).

Таблица 1 - Средние значения оптической глубины проникновения и среднеквадратичные отклонения для частиц различных диаметров

время(мин)	Среднее значение глубины (25nm)	Среднеквадратичное отклонение (25nm)	Среднее значение глубины (100nm)	Среднеквадратичное отклонение (100nm)	Среднее значение глубины (5мкм)	Среднеквадратичное отклонение (5мкм)
0	62	30	48	9	58	28
1	62	28	109	28	85	34
2	99	21	62	14	153	69
3	144	95	103	38	86	45
4	171	49	90	45	87	29
5	197	47	115	83	116	64
6	152	51	153	107	131	63
7	186	60	106	71	155	63
8	194	62	154	80	208	51

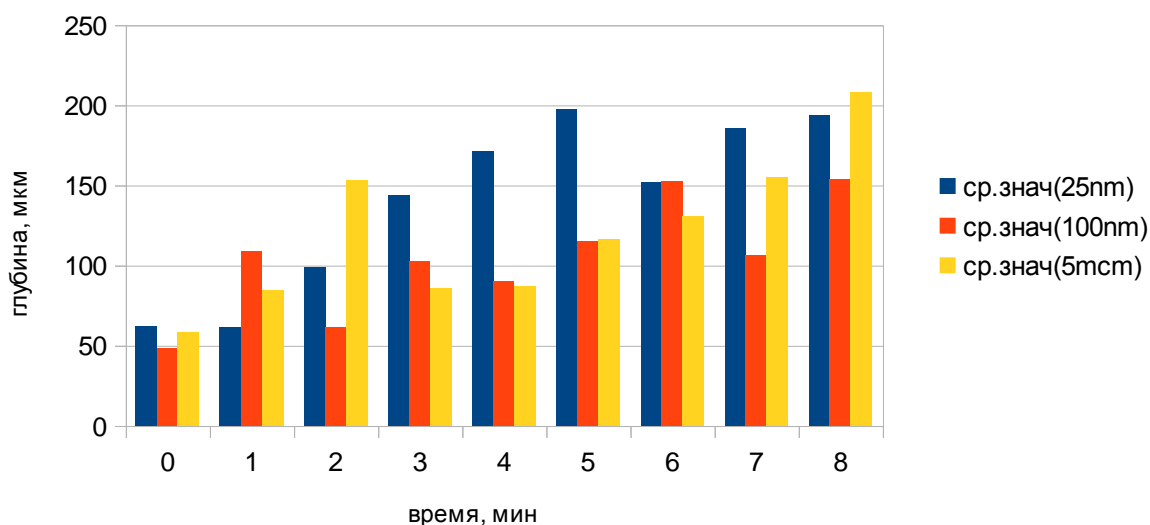


Рисунок 2 - Гистограмма оптических глубин проникновения разномасштабных частиц в волосяной фолликул *ex vivo*.

Полученные средние значения оптической глубины проникновения *in vivo* и среднеквадратичные отклонения для частиц различных диаметров представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Оптическая глубина проникновения частиц разных диаметров в фолликулы *in vivo* под действием ультразвука

Диаметр частиц	Мощность УЗ (Вт)	Время воздействия (мин)	Глубина проникновения через 2 минуты, мкм	Глубина проникновения через 4 минуты, мкм	Среднеквадратичное отклонение, мкм
5 мкм	1	2+2	36	60	9
25 нм	1	2+2	57	99	9
100 нм	1	2+2	15	45	9

Во втором разделе второй части описывается *in vivo* эксперимент с частицами карбоната кальция. Целью этого эксперимента являлся поиск оптимального режима доставки субмикронных частиц путем оптимизации времени воздействия и мощности применяемого УЗ-излучения.

В качестве исследуемых частиц использовались микроконтейнеры CaCO₃ диаметром 900 мкм. Микрочастицы CaCO₃ перспективны в качестве контейнеров для инкапсуляции биологически активных веществ, поскольку обладают пористой структурой и рядом таких достоинств, как биосовместимость, мягкие условия разрушения, простота приготовления и низкая себестоимость [16].

В эксперименте использовалась лабораторная крыса альбинос возрастом около 1 года весом 250-300 г, предварительно анестезированная с помощью Zoletil 50 дозой 0.05 мг/кг.

Для визуализации кожи использовался спектральный оптический когерентный томограф.

Концентрация суспензий частиц составляла 0.5 г/мл. Суспензия наносилась на предварительно депилированные участки кожи крысы и

подвергалась воздействию УЗ мощностью от 0.1 Вт до 2 Вт, время от 1 до 2 минут.

По полученным А-сканам ОКТ-изображений была оценена оптическая глубина проникновения частиц.

Результаты оценки оптической глубины проникновения частиц при различных сочетаниях времени и мощности УЗ воздействия представлены в таблице 3.

Таблица 3 – оптическая глубина проникновения частиц различных диаметров под действием ультразвука

Мощность УЗ (Вт)	Время воздействия (мин)	Глубина проникновения частиц, мкм	Среднеквадратичное отклонение (мкм)
0.1	2	30	9
0.4	2	36	9
0.5	1	33	9
0.5	3	183	9
1	1	78	9
1	2	0	9
2	1	0	9

Далее в работе обсуждаются экспериментальные результаты и формулируется вывод.

В результате *ex vivo* эксперимента с частицами диоксида титана было установлено, что наибольшая средняя глубина проникновения была достигнута частицами диаметром 5 мкм (увеличилась с 58 мкм до 208 мкм), частицы с диаметром 25 нм показали схожие результаты (глубина проникновения увеличилась с 62 мкм до 194 мкм), а наименьшее значение проникновения было получено частицами с диаметром 100 нм (глубина

увеличилась с 48 мкм до 154 мкм). Данные результаты позволяют сделать вывод о том, что диаметр частиц влияет на глубину проникновения внутрь волосяного фолликула.

В результате *in vivo* эксперимента с частицами диоксида титана наибольшая оптическая глубина проникновения в эксперименте с частицами диоксида титана получена для частиц диаметром 25 нм (средняя глубина проникновения составила 99 ± 9 мкм). На меньшую глубину проникли частицы диаметром 100 нм (48 ± 9 мкм) и 5 мкм (60 ± 9 мкм).

В *in vivo* эксперименте по поиску оптимального режима доставки субмикронных частиц карбоната кальция внутрь волосяных фолликулов оказалось, что для достижения оптимальной глубины проникновения частиц карбоната кальция необходимо соблюдение баланса между мощностью УЗ-излучения и временем его приложения: при недостаточной мощности и времени воздействия проникновение частиц было незначительным, при более высокой мощности вне зависимости от времени частицы разрушались без проникновения в фолликулы. Оптимальным режимом оказалась обработка в течение 3-х минут излучением мощностью 0.5 Вт. При этом была достигнута глубина проникновения 183 ± 9 мкм.

Заключение

Данные, полученные в экспериментах с частицами диоксида титана позволяют сделать вывод о том, что диаметр частиц влияет на глубину проникновения внутрь волосяного фолликула. Частицы 25 нм быстрее других достигли максимальной величины проникновения за счет относительно беспрепятственного прохождения вдоль фолликула, остальные частицы также смогли проникнуть внутрь фолликула, но только с течением времени за счет эффекта "наждачной бумаги".

В результате эксперимента с частицами карбоната кальция оказалось, что применение этих частиц в качестве микроконтейнеров для лекарственных средств представляется перспективным для лечения поверхностных или доступных для ультразвукового и оптического воздействия опухолей. Однако следует учитывать, что для достижения оптимальной глубины проникновения частиц карбоната кальция необходимо соблюдение баланса между мощностью УЗ-излучения и временем его приложения: 3-х минутное воздействие мощностью 0.5 Вт.

Список использованных источников

- 1 Lademann J., Knorr F., Richter H., et al., Hair follicles as a target structure for nanoparticles // *J. Innov. Opt. Health Sci.* - 2015. - Vol.8. - P. 1-7.
- 2 Генина, Э. А., Башкатов, А. Н. Лекции по оптической когерентной томографии биотканей : машинопись // Личный архив. 17л.
- 3 Самусев, Р. П., Липченко, В. Я. Атлас анатомии человека. — М. : Оникс 21 век : Мир и образование, 2002. - 704 с.
- 4 Тучин, В. В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. — М. : ФИЗМАТЛИТ, 2012. – 812 с.
- 5 Fang Chia-Lang, et al., Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles // *Therapeutic Delivery.* - 2014. - Vol.5(9).
- 6 E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, V. I. Kochubei, N. A. Lakodina, Altshuler G., V. V. Tuchin, In vitro and in vivo study of dye diffusion into the human skin and hair follicles // *Journal of Biomedical Optics.* - 2002. -Vol. 7(3). -P. 471-477.
- 7 Jung S., Patzelt A., et al., Strategy of topical vaccination with nanoparticles // *Journal of Biomedical Optics.* - 2009. -Vol.14(2). -P. 021001.
- 8 Lademann J., Patzelt A., Richter H., et al., Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles // *Journal of Biomedical Optics.* - 2009. -Vol. 14(2). -P. 021014.

- 9 Kajimoto K., et al., Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis // International Journal of Pharmaceutics. - 2011. -Vol. 403. -P. 57-65.
- 10 Barry B. W., Drug delivery routes in skin: A novel approach // Adv. Drug Delivery Rev. - 2002. -Vol. 54.
- 11 Н. Д. Гладкова, Н. М. Шахова. Руководство по оптической когерентной томографии / Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2007.
- 12 Teichmann A., Otberg N., et al., Follicular penetration: Development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. - 2006. - Vol. 19. -P. 216-223.
- 13 Lademann J., Richter H., et al., Hair follicles- A long-term reservoir for drug delivery // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. - 2006. - Vol. 19. -P. 232-236.
- 14 Lademann J., Richter H., et al., Nanoparticles- An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2007. - Vol. 66. -P. 159-164.
- 15 Toll R., Jacobi U., et al., Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles // J. Invest. Dermatol. - 2004. - Vol. 123. -P. 168-176.
- 16 Свенская Ю. И. Микрочастицы карбоната кальция, содержащие фотосенсибилизатор "Фотосенс": получение, дистанционное высвобождение красителя ультразвуком, *in vivo* применение // Российские нанотехнологии. - 2014. -Т.9 №.7/8. -С. 45-52.
- 17 Самцов, А. В., Барбинов, В. В. Дерматовенерология: учебник для медицинских вузов. —СПб. : СпецЛит, 2008. -352 с.