

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра Оптики и биофотоники

Разработка новых подходов к оптическому просветлению кожи *ex vivo*

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 4082 группы
направления (специальности) 12.03.04 Биотехнические системы и технологии

Института физики

Шептицкого Романа Васильевича

Научный руководитель

проф. д.ф.-м.н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание



подпись, дата

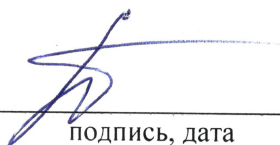
Э.А. Генина

инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой

проф. д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

должность, уч. степень, уч. звание



подпись, дата

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Саратов 2025 год

Введение. Настоящая бакалаврская работа посвящена исследованию оптического просветления (ОП) кожи *ex vivo* с использованием тартразина в сочетании с физическими методами усиления проницаемости кожного барьера.

Данная задача представляет особый интерес, поскольку эффективность современных неинвазивных методов визуализации, таких как оптическая когерентная томография (ОКТ) и спектроскопия, существенно ограничена из-за сильного рассеяния света в поверхностных слоях кожи. Одним из способов повышения глубины зондирования является временное снижение рассеяния с помощью химических оптических просветляющих агентов (ОПА). Однако, из-за барьерных свойств рогового слоя кожи (РС), эффективность таких агентов ограничена. Использование физических методов, таких как ультразвук, лазерное облучение и микроперфорация, позволяет преодолеть эти ограничения, однако их применение в сочетании с новыми просветляющими веществами, например тартразином, изучено недостаточно. Важно понимать механизмы и оценивать эффективность таких комбинированных подходов.

Актуальность работы заключается в необходимости повышения эффективности ОП кожи путем преодоления барьеров кожного покрова. Исследование направлено на поиск устойчивых, глубоких и воспроизводимых эффектов ОП без нарушения структурной целостности ткани.

Научная значимость состоит в экспериментальном обосновании нового подхода к ОП кожи с использованием тартразина в сочетании с физическими методами воздействия. Особое внимание уделяется анализу влияния этих методов на глубину, стабильность и выраженность просветляющего эффекта при помощи спектроскопии и ОКТ.

Целью бакалаврской работы является разработка и экспериментальное обоснование подходов к ОП кожи *ex vivo* с использованием тартразина и физических методов повышения проницаемости кожного барьера.

Задачами выполняемой работы являются:

1. Провести обзор современных методов ОП кожи, выявить их ограничения и определить направления повышения эффективности;
2. Разработать экспериментальный протокол на модели кожи лабораторной крысы *ex vivo* с применением физических методов воздействия и растворов тартразина;
3. Оценить эффективность ОП кожи с использованием спектроскопии и ОКТ;
4. Проанализировать полученные данные и определить влияние физических методов на глубину и стабильность просветляющего эффекта.

Благодарности: Автор выражает благодарность научному руководителю д.ф.-м.н., профессору кафедры оптики и биофотоники Гениной Элине Алексеевне; Суркову Юрию Игоревичу; Серебряковой Изабелле Анатольевне и Коваленко Василию Михайловичу за помощь в проведении исследования и полезные обсуждения.

Структура и объем работы. Бакалаврская работа состоит из введения, 3 разделов, заключения и списка использованных источников, включающего 56 наименований. Работа изложена на 59 страницах машинописного текста, содержит 14 рисунков и 1 таблицу.

Основное содержание работы. Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, определены объект и предмет исследования, раскрыты научная новизна и практическая значимость результатов.

Первый раздел состоит из пяти подразделов. *Первый подраздел* посвящен структуре кожи и ее оптическим свойствам. Кожа состоит из эпидермиса, дермы и гиподермы. Эпидермис содержит меланин, обуславливающий высокое поглощение в видимом диапазоне [1]. В дерме преобладает рассеяние за счет коллагеновых волокон [2]. Гиподерма характеризуется низким рассеянием и высокой липидной насыщенностью. Распределение коэффициентов рассеяния и поглощения зависит от длины волны, степени гидратации и содержания белков

[1]. Волосяные фолликулы, потовые железы и капилляры формируют возможные пути диффузии просветляющих агентов.

Второй подраздел посвящен химическим методам ОП кожи. Глицерин, полиэтиленгликоль, глюкоза, диметилсульфоксид и йодсодержащие контрастные вещества используются в качестве ОПА. Глицерин снижает рассеяние за счет выравнивания показателя преломления [3]. ДМСО обладает высокой проникающей способностью и выраженным эффектом ОП [4]. Омнипак эффективен в глубоких слоях дермы при низкой дегидратации [5]. Комбинированное применение веществ усиливает эффект, например, смесь глицерина с ДМСО. В условиях *ex vivo* эффект выражен стабильнее, чем *in vivo* [3].

Третий подраздел посвящен физическим методам повышения проницаемости кожи. Сонофорез усиливает проницаемость кожи за счет кавитации и микроструй [6]. Лазерная абляция создает микроканалы для доставки веществ в дерму. Микроиглы формируют контролируемые пути для диффузии без повреждения глубоких слоев [7]. Механическая абразия снижает сопротивление РС [8]. Локальное нагревание увеличивает подвижность липидов и проницаемость эпидермиса. Совместное применение физических методов с просветляющими веществами повышает эффективность.

Четвертый подраздел посвящен тартразину как перспективному просветляющему агенту. Тартразин изменяет комплексный показатель преломления ткани за счет своей π -системы и полярных групп [9]. При концентрации 0.6 М снижает рассеяние и увеличивает прозрачность без дегидратации. Повышает глубину визуализации мышц и кожи до 2 мм в ближнем ИК-диапазоне [9]. Усиливает сигналы во флуоресцентной и нелинейной микроскопии. В экспериментах с ОКТ дает прирост отраженного сигнала на 19 дБ [10]. Обладает низкой токсичностью, совместим с визуализацией, эффект обратим [9].

Пятый подраздел посвящен ОКТ и спектральным методам оценки эффективности ОП. ОКТ регистрирует динамику изменений прозрачности и глубины визуализации тканей после нанесения просветляющих агентов [11]. Увеличение сигнала и снижение рассеяния наблюдается уже через 3–5 минут после обработки. Спектроскопия с интегрирующей сферой позволяет количественно определить коэффициенты поглощения и рассеяния в диапазоне 400–2500 нм [12]. Совмещение методов обеспечивает объективную оценку эффективности ОП в морфологическом и спектральном аспектах.

Второй раздел посвящен описанию материалов и методов исследования.

Материалом для исследования послужили 5 образцов кожи *ex vivo*, иссеченных с бедра лабораторной крысы. Толщина образцов составляла 1.204 ± 0.125 мм. После депиляции и удаления жировой ткани образцы фиксировались между стеклами для визуализации.

Для регистрации использовали ОКТ (Thorlabs, 930 нм), расчет коэффициента рассеяния выполнялся по методу, подробно описанному в работах [13, 14, 15] и реализованному в программном обеспечении, разработанном Ю.И. Сурковым. Спектры полного пропускания и отражения (350–1500 нм) измерялись на спектрофотометре UV-3600 с интегрирующей сферой. Оценка μ_a и μ_s' производилась с помощью инверсного метода добавления-удвоения [16, 17]. Показатель преломления кожи был принят равным— 1.41 [18, 19].

В качестве ОПА применялся 30% w/v раствор тартразина. Раствор готовился в дистиллированной воде $60 \pm 5^\circ\text{C}$, при нанесении температура раствора составляла $40 \pm 5^\circ\text{C}$.

Использовали следующие методы повышения проницаемости кожи:

1. пассивная диффузия (15 мин),
2. микродермабразия (tape-stripping),
3. сонофорез (1 МГц, 1 Вт/см², 5 мин),
4. микроперфорация (глубина проникновения игл 500 мкм, 5 мин),

5. комбинированный метод: микродермабразия, нанесение ОПА с последующей 5 минутной микроперфорацией и ультразвуковым воздействием в течение 5 минут каждым методом последовательно.

На рисунке 1 представлена схема физических методов воздействия для увеличения проницаемости кожи.

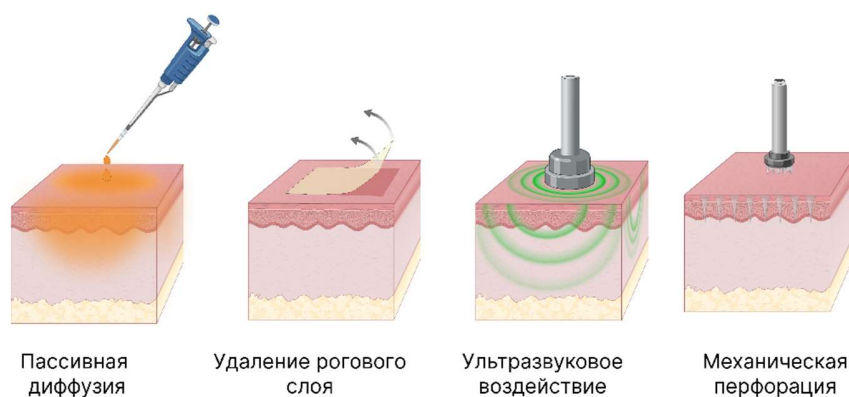


Рисунок 1 - Схематичное представление физических методов воздействия, направленных на увеличение проницаемости кожи

Образцы 3–5 фиксировались на тушке крысы для имитации условий приближенных к *in vivo*. Регистрация цифровых и ОКТ-изображений, спектров диффузного рассеяния и полного пропускания производилась до и после ОП.

В третьем разделе представлены результаты исследования.

На рисунке 2 представлены цифровые изображения образцов кожи до (интактные) и после нанесения растворов тартразина и применения физических методов усиления проницаемости. Можно заметить увеличение контраста темных полос после ОП 30% водным раствором тартразина для всех образцов, что свидетельствует об уменьшении рассеяния.

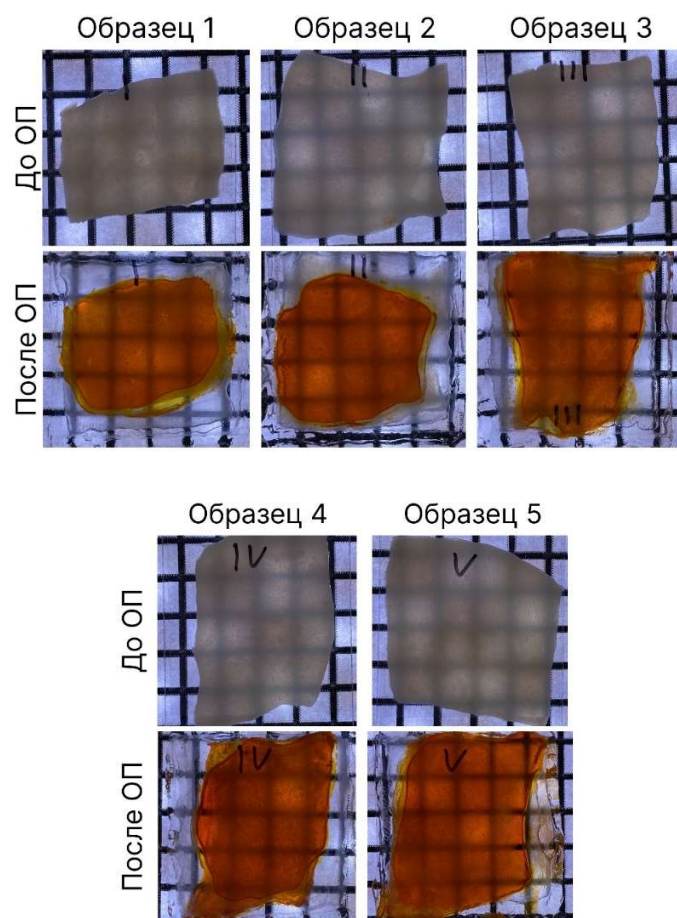


Рисунок 2 - Типичные цифровые изображения образцов кожи лабораторной крысы до и после 15 минут оптического просветления 30% раствором тартразина

На рисунке 3 представлены типичные ОКТ изображения образцов кожи *ex vivo* лабораторной крысы до и после ОП и применения физических методов увеличения проницаемости кожи. Можно заметить, что до ОП нижняя граница образца не наблюдается ни на одном из образцов, в то время как после ОП нижняя граница между образцом и предметным стеклом становится наблюдаемой, что в большей степени выражено для третьего образца. Общая интенсивность ОКТ сигнала снижена после ОП относительно интактного состояния, что является следствием уменьшения доли обратно рассеянного сигнала при оптическом

просветлении. Кроме того, наблюдаются изменения в структуре кожи после ОП 30% раствором тартразина, например утолщение эпидермального слоя.

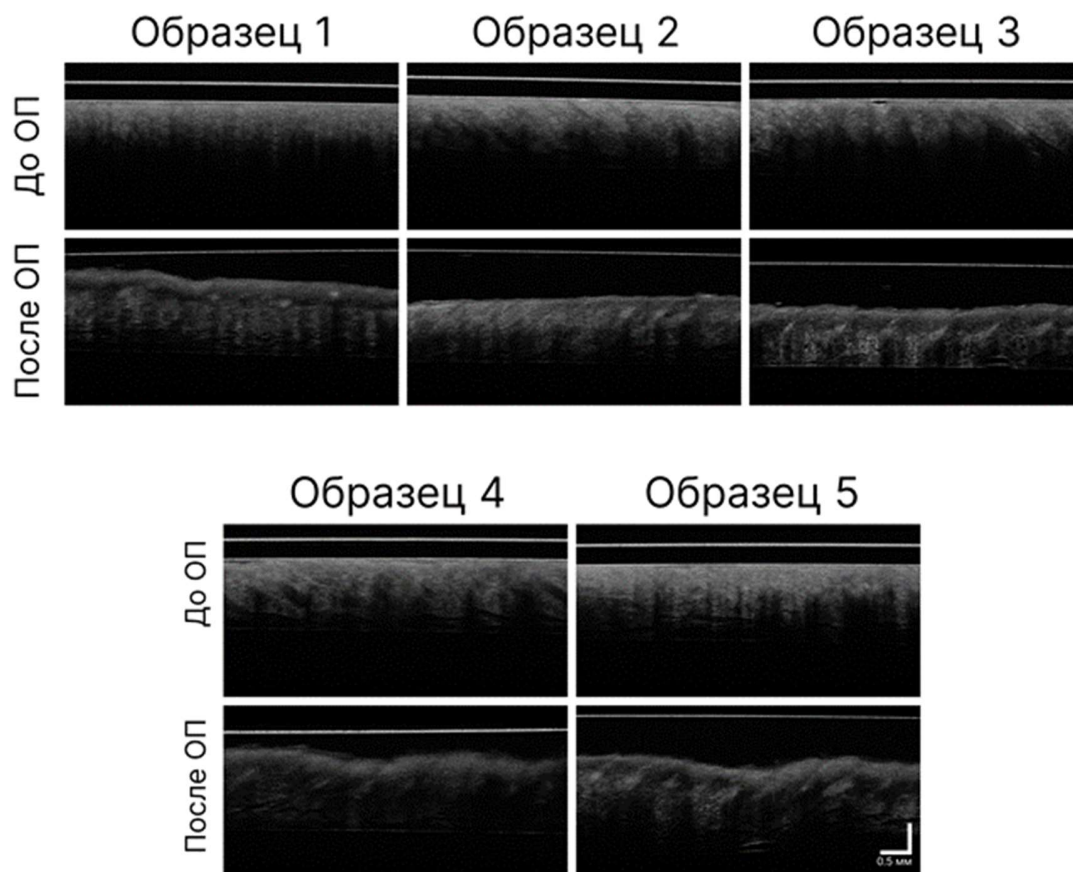


Рисунок 3 - Типичные ОКТ-изображения образцов кожи *ex vivo* лабораторной крысы до и после ОП 30% раствором тартразина

На рисунке 4 представлены изображения реконструированного коэффициента рассеяния по ОКТ изображениям из рисунка 3. Можно наблюдать значительное уменьшение коэффициента рассеяния зондирующего излучения при ОП 30% раствором тартразина. Наиболее выраженный эффект ОП наблюдается у образцов 3, 4 и 5. В то время как образцы 1 и 2 отличаются незначительно, что может связано с меньшей эффективностью дермабразии по сравнению с сонофорезом и микроперфорацией кожи. Кроме того, в результате

ОП контраст между дермой и тканями волосяного фолликула стали более контрастными, что видно, например, на образцах 4 и 5.

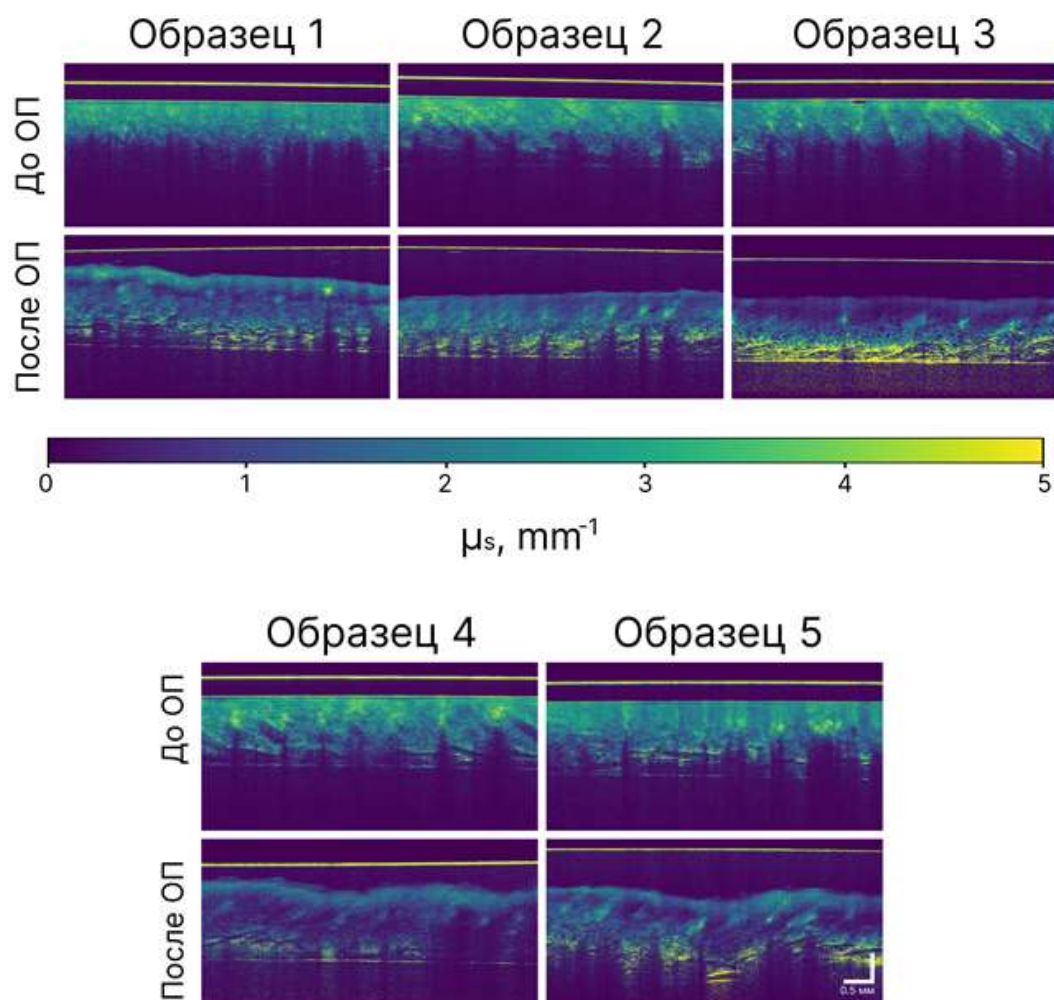


Рисунок 4 - Изображения реконструированного коэффициента рассеяния кожи *ex vivo* лабораторной крысы до и после ОП 30% раствором тартразина

На рисунке 5 представлены полученные спектры полного пропускания и диффузного отражения в сферу образцов кожи до и после ОП и физических методов увеличения пропускания. Можно заметить увеличение коэффициентов полного пропускания и уменьшение диффузного отражения после ОП.

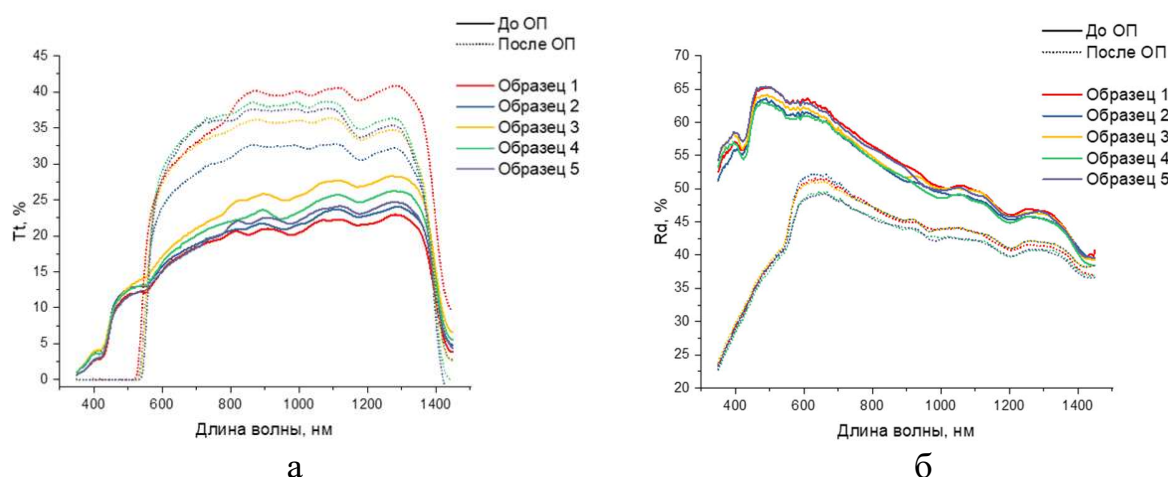


Рисунок 5 - Спектры полного пропускания T_t (а) и диффузного отражения R_d (б) образцов кожи до и после ОП 30% раствором тартразина

На рисунке 6 представлены спектры коэффициентов поглощения и эффективного рассеяния до и после ОП. Можно заметить увеличение коэффициентов поглощения в диапазоне поглощения тартразина. Также наблюдается уменьшение коэффициента рассеяния при ОП, при этом наибольшее падение μ_s' при УЗВ, микроперфорации и комбинации методов, что согласуется с данными ОКТ.

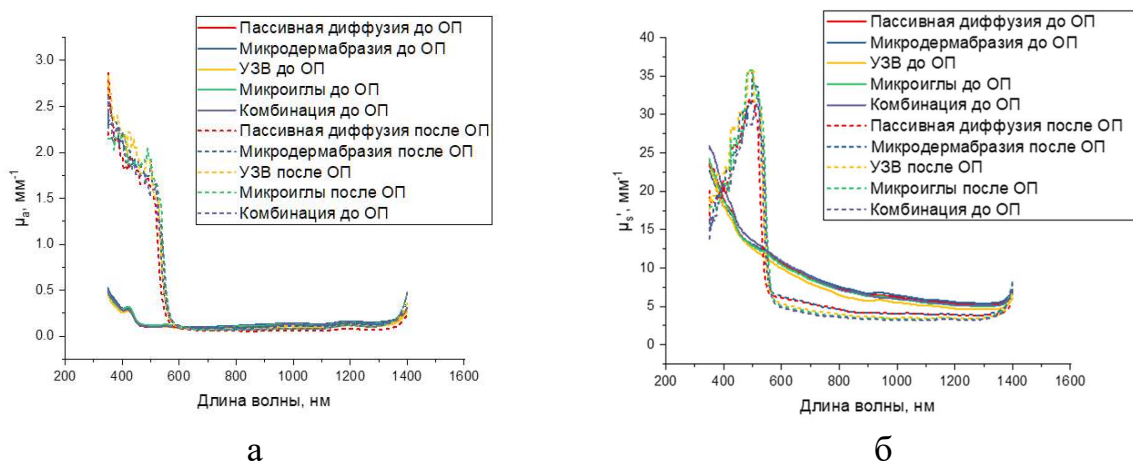


Рисунок 6 - Спектры коэффициента поглощения (а) и эффективного коэффициента рассеяния (б) кожи *ex vivo* до и после ОП 30% раствором тартразина и физическими методами усиления проницаемости

На рисунке 7 представлены диаграммы коэффициента поглощения и эффективного коэффициента рассеяния до и после ОП на длинах волн 430, 544 и 800 нм. Можно заметить, что коэффициент поглощения на длинах волн 430 и 544 нм увеличился после ОП, так как на этих длинах волн наблюдается поглощение красителя, в то время как поглощение на длине волны 800 нм не изменилось. Эффективный коэффициент рассеяния уменьшился на длине волны 800 нм в результате ОП 30% раствором тартразина. Наибольшее снижение наблюдается при комбинации трех методов повышения проницаемости кожи. В то время как микродермабразия практически не отличается от пассивной диффузии.

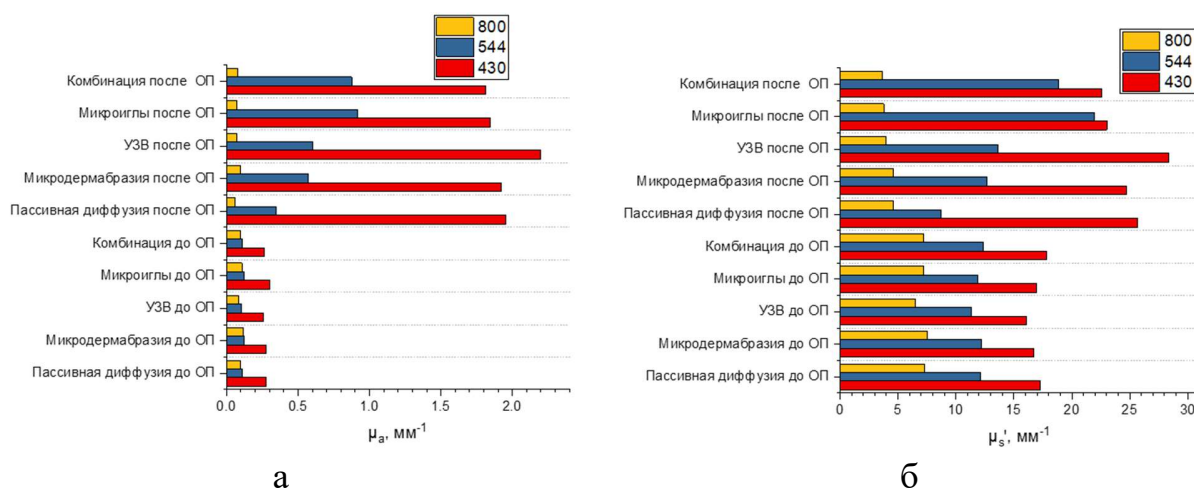


Рисунок 7 - Диаграммы коэффициента поглощения (а) и эффективного коэффициента рассеяния (б) до и после ОП 30% раствором тартразина образцов кожи *ex vivo* лабораторной крысы на длинах волн 430, 544 и 800 нм для разных физических методов повышения проницаемости кожи

Таким образом пассивная диффузия уменьшает коэффициент эффективного рассеяния на 36%, микродермабразия на 38%, ультразвуковое воздействие на 39%, микроперфорация с помощью микроириглов на 47%, а комбинация всех методов на 49%.

В **заключении** подводятся итоги бакалаврской работы и излагаются ее основные результаты. В ходе работы были проведены экспериментальные

исследования по ОП кожных тканей *ex vivo* с использованием 30% раствора тартразина в сочетании с физическими методами повышения проницаемости кожи — микродермабразией, микроперфорацией и ультразвуковым воздействием.

Полученные результаты показали, что наибольший эффект достигается при их комбинированном применении, что приводит к почти двукратному снижению эффективного коэффициента рассеяния. Это указывает на выраженное снижение светорассеяния в коже и синергетическое действие методов на РС.

Среди индивидуальных методов наибольшую эффективность продемонстрировала микроперфорация. Ультразвуковое воздействие обеспечило умеренный, но стабильный эффект и может быть перспективным для неинвазивного *in vivo* применения. Микродермабразия и пассивная диффузия оказались наименее эффективными.

Таким образом, в данной бакалаврской работе были получены данные, подтверждающие возможность значительного повышения оптической прозрачности кожных тканей с помощью тартразина и физических методов воздействия. Эти результаты могут быть использованы при разработке неинвазивных методов оптической визуализации и трансдермальной доставки, а также служить основой для дальнейших исследований *in vivo*.

Список использованных источников

- Jacques S. L. Optical properties of biological tissues: a review //Physics in Medicine & Biology. – 2013. – Т. 58. – №. 11. – С. R37.
1. Genina E. A. et al. Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2015. – Т. 1. – №. 1. – С. 22-58.
 2. Сдобнов А. Ю. Исследование оптического просветления кожи методами многофотонной томографии и спектроскопии комбинационного рассеяния: диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 03.01.02. – Саратов, 2021. – 126 с.
 3. Zimmerley M. et al. Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy //Applied optics. – 2009. – Т. 48. – №. 10. – С. D79-D87.
 4. Янина И. Ю. и др. Исследование эффективности оптического просветления кожи растворами глицерина методом конфокальной микроспектроскопии комбинационного рассеяния света //Оптика и спектроскопия. – 2020. – Т. 128. – №. 6. – С. 753-759.
 5. Vranić E. Sonophoresis-mechanisms and application //Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. – 2004. – Т. 4. – №. 2. – С. 25.
 6. Waghule T. et al. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system //Biomedicine & pharmacotherapy. – 2019. – Т. 109. – С. 1249-1258.
 7. Escobar-Chavez J. J. et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin //Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences. – 2008. – Т. 11. – №. 1. – С. 104-130.
 8. Ou Z. et al. Achieving optical transparency in live animals with absorbing molecules //Science. – 2024. – Т. 385. – №. 6713. – С. eadm6869.

9. Narawane A. et al. Optical clearing with tartrazine enables deep transscleral imaging with optical coherence tomography //Journal of biomedical optics. – 2024. – Т. 29. – №. 12. – С. 120501-120501.
10. Тучин В. В. Оптика биологических тканей. – 2012.
11. Cheong W. F., Prahl S. A., Welch A. J. A review of the optical properties of biological tissues //IEEE journal of quantum electronics. – 2002. – Т. 26. – №. 12. – С. 2166-2185.
12. Moldon P. A. et al. Influence of optical clearing agents on the scattering properties of human nail bed and blood microrheological properties: In vivo and in vitro study //Journal of Biophotonics. – 2024. – С. e202300524.
13. Vermeer K. A. et al. Depth-resolved model-based reconstruction of attenuation coefficients in optical coherence tomography //Biomedical optics express. – 2013. – Т. 5. – №. 1. – С. 322-337.
14. Chang S., Bowden A. K. Review of methods and applications of attenuation coefficient measurements with optical coherence tomography //Journal of biomedical optics. – 2019. – Т. 24. – №. 9. – С. 090901-090901.
15. Prahl S. A., van Gemert M. J. C., Welch A. J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method //Applied optics. – 1993. – Т. 32. – №. 4. – С. 559-568.
16. Bashkatov A. N. et al. Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm //Optics and spectroscopy. – 2016. – Т. 120. – С. 1-8.
17. Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review //Journal of innovative optical health sciences. – 2011. – Т. 4. – №. 01. – С. 9-38.
18. Khan R. et al. Refractive index of biological tissues: Review, measurement techniques, and applications //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2021. – Т. 33. – С. 102192.

