

## ОПТИЧЕСКОЕ ПРОСВЕТЛЕНИЕ ТКАНЕЙ КОЖИ *EX VIVO* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

© 2016 г. Д. К. Тучина\*, В. Д. Генин\*, А. Н. Башкатов\*\*\*, Э. А. Генина\*\*\*, В. В. Тучин\*\*\*

\* Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

\*\* Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

\*\*\* Институт проблем точной механики и управления РАН, 410028 Саратов, Россия

E-mail: tuchinadk@mail.ru

Поступила в редакцию 16.08.2015 г.

Экспериментально исследовано изменение оптических и структурных (веса, толщины и площади) параметров кожи под действием полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 300 и 400 дальтон. В качестве объектов исследования использовались *ex vivo* образцы кожи белых лабораторных крыс. Измерение коллимированного пропускания кожи было выполнено в диапазоне длин волн 500–900 нм. В результате воздействия агентов наблюдались увеличение коллимированного пропускания и уменьшение веса, толщины и площади образцов кожи. Анализ кинетики изменения исследуемых параметров позволил измерить коэффициент диффузии агентов в коже:  $(1.83 \pm 2.22) \times 10^{-6}$  и  $(1.70 \pm 1.47) \times 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с соответственно для ПЭГ-300 и ПЭГ-400 и скорость изменения структурных параметров. Полученные результаты могут быть использованы для развития существующих и разработки новых методов неинвазивной диагностики и терапии подкожных заболеваний.

DOI: 10.7868/S0030403416010220

### ВВЕДЕНИЕ

Относительно низкая себестоимость оптических методов диагностики и лечения различных заболеваний, а также их безопасность для здоровья пациентов привели к тому, что эти методы сегодня активно используются в медицине [1–3]. В то же время доставка зондирующего излучения через поверхность биоткани на необходимую глубину остается одной из основных задач современной лазерной медицины. Сложность решения данной задачи связана с тем, что пространственное разрешение и глубина зондирования излучением в видимом и ближнем ИК спектральных диапазонах сильно ограничены рассеивающей способностью биотканей [3]. Поскольку основной причиной рассеяния оптического излучения в биотканях является различие показателей преломления структурных компонентов биотканей и внутритканевой жидкости или внутриклеточных органелл и клеточной цитоплазмы [3], то одним из возможных путей решения данной проблемы может быть снижение светорассеяния за счет замещения внутритканевой жидкости неким биосовместимым иммерсионным агентом, т.е. использование так называемой техники “оптического просветления биотканей” [3–7].

В настоящее время снижение светорассеяния биотканей под влиянием просветляющих агентов (ПА) связывают с тремя основными процессами:

осмотической дегидратацией биоткани, частичным замещением иммерсионным агентом внутритканевой жидкости и структурной модификацией или диссоциацией волокон коллагена биоткани [5–11]. Два первых процесса обычно проявляются одновременно. Степень вклада каждого из них в эффект просветления определяется типом ПА и свойствами биоткани. Влияние третьего процесса становится заметным только при длительном воздействии ПА на биоткань.

Благодаря своей эффективности, доступности и биосовместимости полиэтиленгликоль может успешно применяться в качестве ПА [12–17]. Полиэтиленгликоль (сокращенно – ПЭГ, химическая формула:  $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$ ) – полимер этиленгликоля ( $C_2H_6O_2$ ), принадлежащего к классу двухатомных спиртов. В зависимости от молекулярного веса полиэтиленгликоль может быть вязкой жидкостью, гелеобразным или твердым веществом. ПЭГ-300 и ПЭГ-400 являются прозрачными, вязкими, бесцветными жидкостями с молекулярным весом 300 и 400 дальтон и обладают сильными гигроскопическими свойствами, ослабевающими с увеличением молекулярного веса [18, 19]. Полиэтиленгликоль активно применяется в медицине и косметологии как основа для мазей, зарегистрирован в качестве пищевой добавки E1521, используется как растворитель, экстрагент, консервант, а также сильный осмотик [18].

**Таблица 1.** Показатели преломления ПЭГ-300 и ПЭГ-400, измеренные на разных длинах волн

$\lambda$ , нм	450	480	486	546	589	644	656	680	930	1100	1300	1550
ПЭГ-300	1.4709	1.4685	1.4682	1.4650	1.4631	1.4610	1.4604	1.4596	1.4559	1.4544	1.4501	1.4460
ПЭГ-400	1.4733	1.4708	1.4706	1.4670	1.4649	1.4633	1.4627	1.4620	1.4581	1.4567	1.4526	1.4483

**Таблица 2.** Коэффициенты интерполяции спектральной зависимости показателя преломления ПЭГ-300 и ПЭГ-400

	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_4$	$a_5$	$a_6$	$a_7$
ПЭГ-300	0.23858	0.02777	$-2.28051 \times 10^{-3}$	$-6.28375 \times 10^{-4}$	$4.23549 \times 10^{-3}$	-88.63291	$-5.08374 \times 10^4$	-0.02324
ПЭГ-400	0.23821	0.02743	$-2.6284 \times 10^{-3}$	$-6.05667 \times 10^{-4}$	$4.28405 \times 10^{-3}$	-68.04619	$-3.85264 \times 10^4$	-0.02098

Информация о коэффициентах диффузии ПА в биотканях и о процессах, протекающих при взаимодействии ПА с биотканями, может быть использована для разработки новых и оптимизации уже существующих методов оптического просветления биотканей. Ранее коэффициенты диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 были измерены в роговом слое эпидермиса кожи [20], роговице и конъюнктиве глаза и агарозном геле, моделирующем эпителиальную мембрану. Однако, несмотря на достаточно широкое применение ПЭГ как в косметологии, так и в качестве просветляющего агента, анализ доступной нам литературы показывает, что диффузия ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в тканях кожи исследована недостаточно [14, 20–23].

Целью настоящей работы являлось исследование временной зависимости изменения оптических, весовых и геометрических параметров кожи *ex vivo* при воздействии на нее ПЭГ и измерение коэффициентов диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в тканях кожи.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1.1. Объекты исследования и оптические просветляющие агенты

Исследования были выполнены *ex vivo* на 80 образцах кожи белых лабораторных крыс (по 10 образцов для исследования кинетики изменения каждого параметра: коллимированного пропускания, веса, толщины и площади для каждого исследуемого агента). Перед проведением экспериментов шерсть с поверхности кожи удалялась с помощью крема-депилятора “Veet” (Reckitt Benckiser, Франция). С помощью хирургических ножниц вырезались образцы кожи размером приблизительно  $10 \times 15$  мм. Подкожный жировой слой, препятствующий проникновению гидрофильных веществ в дерму, удалялся.

В качестве ПА использовались полиэтиленгликоль-300 (ПЭГ-300, молекулярный вес 300 дальтон, Sigma-Aldrich, Германия) и полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400, молекулярный вес 400 дальтон, Sigma-Aldrich, Бельгия). Плотность ПЭГ-300 – 1.125 г/мл, вязкость  $\sim 95$  г/(м · с) [24]. Плотность

ПЭГ-400 – 1.126 г/мл, вязкость  $\sim 120$  г/(м · с) [25]. Осмотическое давление используемых растворов вычислялось с использованием соотношения [26]

$$P = \alpha C + \beta C^2,$$

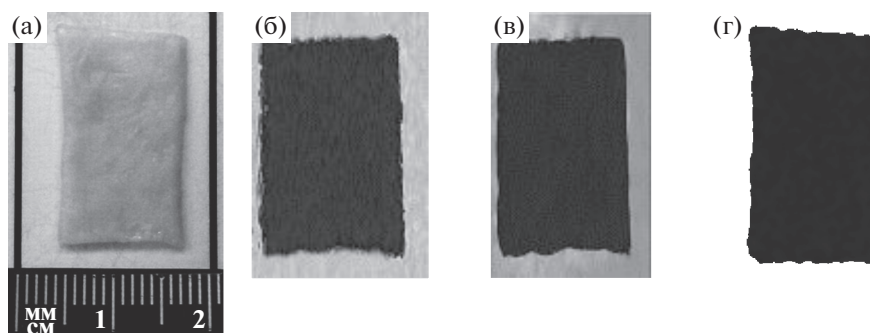
где  $P$  – осмотическое давление, МПа;  $C$  – молярная концентрация, моль/литр; для ПЭГ-300:  $\alpha = 1.7$ ,  $\beta = 3.3$  и для ПЭГ-400:  $\alpha = 1.6$ ,  $\beta = 5.0$  [26]. Соответственно (с учетом того, что  $C_{\text{ПЭГ-300}} = 3.750$  моль/л и  $C_{\text{ПЭГ-400}} = 2.815$  моль/л) осмотическое давление ПЭГ-300 составляет 52.8 МПа, осмотическое давление ПЭГ-400 – 44.1 МПа.

Зависимость коэффициента диффузии ПЭГ в воде, выраженного в  $\text{м}^2/\text{с}$ , от молекулярной массы  $M_w$  при малых концентрациях описывается, согласно [27], выражением:  $D_0(M_w) = 7 \times 10^{-9} M_w^{-0.46}$ . Отсюда следует, что для ПЭГ-300  $D_0 = 5.08 \times 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ , а для ПЭГ-400  $D_0 = 4.45 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ .

Показатели преломления ПА измерялись на многоволновом рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (ATAGO, Япония) на 12 длинах волн в диапазоне от 450 до 1550 нм и интерполировались. Результаты измерений представлены в табл. 1. Интерполяция выполнялась с использованием соотношения [28]

$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \frac{1}{\rho^*} = a_0 + a_1 \rho^* + a_2 T^* + a_3 \lambda^{*2} T^* + a_4 \lambda^{*2} + \frac{a_5}{\lambda^{*2} - \lambda_{UV}^{*2}} + \frac{a_6}{\lambda^{*2} - \lambda_{IR}^{*2}} + a_7 \rho^{*2},$$

где  $n$  – показатель преломления ПЭГ,  $\rho^* = \rho/\rho_0$  – относительная плотность просветляющего агента,  $\rho_0 = 1$  г/мл;  $\lambda^* = \lambda/\lambda_0$  – относительная длина волны,  $\lambda_0 = 589$  нм;  $\lambda_{UV} = 229.202$  нм,  $\lambda_{IR} = 5432.937$  нм,  $\lambda$  – длина волны в нм,  $T^* = T/T_0$  – относительная температура просветляющего агента,  $T_0 = 273.15$  К. В табл. 2 приведены коэффициенты интерполяции для используемых просветляющих агентов.



**Рис. 1.** Изображение образца биоткани на тест-объекте (а), синяя компонента изображения образца кожи (б), изображение после обработки медианным фильтром (в), результат цифровой обработки изображения (г).

### 1.2. Измерение весовых и геометрических параметров кожи

Толщина образцов измерялась микрометром с точностью  $\pm 10$  мкм: каждый образец помещался между двумя предметными стеклами, после чего толщина измерялась в пяти точках; результаты усреднялись.

Весовые измерения проводились на электронных весах (Scientech, SA210, США) с точностью  $\pm 1$  мг.

Для вычисления площади образца его помещали на тест-объект с масштабной линейкой и фотографировали с помощью цифровой камеры. С помощью масштабной линейки вычислялся коэффициент перехода от линейных размеров в пикселях к линейным размерам в миллиметрах и определялся размер всего изображения. Из полноцветного изображения (рис. 1а) выделялась синяя компонента как наиболее контрастная (рис. 1б), которая для устранения шумов и бликов обрабатывалась медианным фильтром (рис. 1в).

Поскольку яркость пикселей фона (при анализе синей компоненты изображения) выше, чем яркость пикселей образца кожи, то всем пикселям с определенной пороговой яркостью (в нашем случае лежащей в диапазоне 190–200 ед.) присваивалось значение 255 (рис. 1г). Число пикселей, занимаемых образцом (со значениями, отличными от 255), подсчитывалось и переводилось в квадратные миллиметры с помощью уравнения

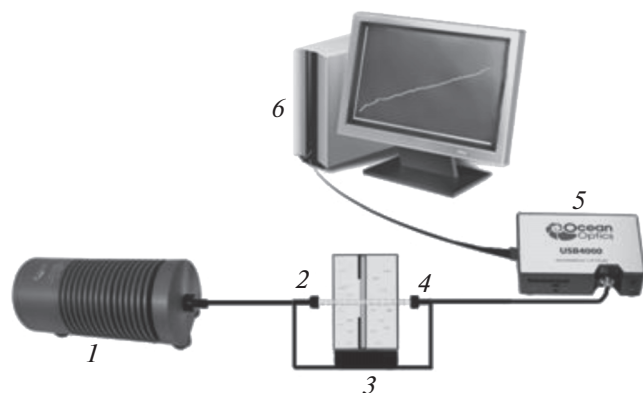
$$S = \frac{F(H_s)}{\text{cols}(H_s)\text{rows}(H_s)} \frac{\text{rows}(H)z^2}{\text{cols}(H)},$$

где  $F$  – число пикселей занимаемых образцом,  $\text{cols}$  – количество колонок,  $\text{rows}$  – количество строк,  $H_s$  – изображение образца на белом фоне,  $H$  – исходное изображение,  $z$  – ширина изображения.

Для измерения кинетики изменения толщины, площади и веса образцы кожи помещались в чашку Петри с ПА. Измерения каждого параметра проводились до помещения образцов в ПА, а затем каждые 5–10 мин после помещения их в ПА в течение 1.5–2 ч иммерсирования.

### 1.3. Измерение кинетики коллимированного пропускания образцов кожи

Измерение спектров коллимированного пропускания образцов кожи проводилось с помощью спектрометра USB4000-Vis-NIR (Ocean Optics, США). Образец кожи закреплялся на пластине размером  $38 \times 17$  мм с отверстием  $8 \times 8$  мм и помещался в стеклянную кювету с ПА объемом 5 мл. Кювета устанавливалась между двумя 400 мкм оптическими волокнами P400-1-UV-VIS (Ocean Optics, США). Для обеспечения коллимированности пучка на торцах волокон с помощью стандартных разъемов SMA-905 закреплялись коллиматоры 74-ACR (Ocean Optics, США). В качестве источника излучения использовалась галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США). Схема установки представлена на рис. 2.



**Рис. 2.** Схема экспериментальной установки для измерения коллимированного пропускания образца кожи. 1 – галогенная лампа HL-2000, 2, 4 – оптические волокна с коллиматорами, 3 – кювета с образцом, 5 – спектрометр USB4000-Vis-NIR, 6 – персональный компьютер.

Кинетика изменения коллимированного пропускания регистрировалась путем последовательной записи спектров коллимированного пропускания в диапазоне 500–900 нм каждые 5–10 мин в течение 1.5–2 ч. Все измерения проводились при комнатной температуре (~20°C).

1.4. Оценка коэффициентов диффузии ПА в коже

Хорошо известно, что диффузия в биоткань гиперосмотического вещества, у которого показатель преломления больше, чем у внутриклеточной жидкости, и отток воды из биоткани приводят к согласованию показателей преломления рассеивателей и внутриклеточной жидкости, более плотной упаковке компонентов биоткани, и следовательно, к уменьшению коэффициента рассеяния [4–7, 29].

Метод оценки коэффициентов диффузии иммерсионных жидкостей в биоткани основан на анализе кинетики изменения коллимированного пропускания образцов биоткани, помещенных в ПА, которое меняется в результате осмотического действия ПА и его диффузии в биологическую ткань [29, 30]. Коэффициент диффузии в данном случае представляет собой среднюю скорость обменного потока ПА в биоткань и воды из биоткани.

Процесс транспорта иммерсионных жидкостей в фиброзных тканях может быть описан в рамках модели свободной диффузии. Геометрически образец биоткани представляется в виде плоскопараллельной пластины конечной толщины  $l$ , см, состоящей из рассеивающих диэлектрических цилиндров (коллагеновых и эластиновых волокон). Одномерное уравнение диффузии имеет вид [29, 30]

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2}, \quad (1)$$

где  $C(x, t)$  – концентрация ПА в коже, г/мл;  $D$  – коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/с;  $t$  – время диффузии, с; и  $x$  – пространственная координата по толщине образца кожи, см.

Поскольку объем ПА (~5000 мм<sup>3</sup>) в кювете значительно превышает объем образца кожи (~100–150 мм<sup>3</sup>), то можно считать, что проникновение ПЭГ в образец кожи не приводит к изменению концентрации ПА в кювете. Проникновение ПА в кожу происходит преимущественно со стороны дермы, что объясняется защитными свойствами эпидермиса, препятствующего проникновению молекул ПА в кожу. Для односторонней диффузии граничные условия имеют вид

$$C(0,t) = C_0 \quad \text{и} \quad \frac{\partial C(l,t)}{\partial x} = 0, \quad (2)$$

где  $C_0$  – концентрация ПЭГ в кювете, г/мл. Второе граничное условие отражает тот факт, что диффузия иммерсионной жидкости внутрь образца кожи происходит только с одной стороны образца, т.е. со стороны дермы.

Начальные условия отражают отсутствие ПА во всех внутренних точках образца биоткани до его помещения в раствор:

$$C(x,0) = 0. \quad (3)$$

Решение уравнения (1) учетом граничных (2) и начальных (3) условий имеет вид

$$C(x,t) = C_0 \left( 1 - \sum_{i=0}^{\infty} \frac{4}{\pi(2i+1)} \sin\left(\frac{(2i+1)\pi x}{2l}\right) \times \exp\left(-\frac{(2i+1)^2 D \pi^2 t}{4l^2}\right) \right).$$

Средняя концентрация ПА в образце кожи  $C(t)$  в каждый момент времени определяется выражением

$$C(t) = C_0 \left( 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{(2i+1)^2} \times \exp\left(-\frac{(2i+1)^2 \pi^2 D t}{4l^2}\right) \right). \quad (4)$$

В первом приближении уравнение (4) может быть представлено в виде

$$C(t) \approx C_0 (1 - \exp(-t / \tau_D)), \quad (5)$$

где

$$\tau_D = \frac{4l^2}{\pi^2 D}, \quad (6)$$

$\tau_D$  – характеристическое время диффузии.

По мере проникновения иммерсионной жидкости в кожу происходит увеличение показателя преломления  $n_1(t)$  внутриклеточной жидкости. Оценка величины показателя преломления внутриклеточной жидкости в зависимости от времени может быть выполнена на основе закона Гладстона–Даля [31], в случае двухкомпонентных растворов имеющего вид

$$n_1(\lambda, t) = n_{10}(\lambda)(1 - C(t)) + n_{PEG}(\lambda)C(t), \quad (7)$$

где  $\lambda$  – длина волны, нм;  $n_{10}(\lambda)$  – показатель преломления внутриклеточной жидкости кожи в начальный момент времени, зависящий от длины волны [32]:

$$n_{10}(\lambda) = 1.351 + \frac{2134.2}{\lambda^2} + \frac{5.79 \times 10^8}{\lambda^4} - \frac{8.15 \times 10^{13}}{\lambda^6}, \quad (8)$$

$n_{PEG}(\lambda)$  – спектральная зависимость показателя преломления ПЭГ.

Так как толщина дермы является доминирующей по отношению к толщине других слоев кожи, то оптические характеристики кожи определяются в основном оптическими свойствами дермы. Спектральная зависимость показателя преломления коллагеновых волокон имеет вид [33]

$$n_s(\lambda) = 1.439 + \frac{15880.4}{\lambda^2} - \frac{1.48 \times 10^9}{\lambda^4} + \frac{4.39 \times 10^{13}}{\lambda^6}. \quad (9)$$

Для количественной оценки изменения коэффициента рассеяния кожи использовалось уравнение [29, 30, 34]

$$\mu_s(\lambda, t) = \frac{\varphi_s(t)}{\pi a^2} \sigma_s(\lambda, t) \frac{(1 - \varphi_s(t))^3}{1 + \varphi_s(t)}, \quad (10)$$

где  $\varphi_s(t)$  – объемная доля рассеивателей, зависящая от времени;  $a$  – радиус рассеивателей;  $\sigma_s(\lambda, t)$  – поперечное сечение рассеяния, зависящее от времени [35]:

$$\sigma_s(\lambda, t) = \frac{\pi^2 a x^3(\lambda, t)}{8} (m^2(\lambda, t) - 1)^2 \times \left( 1 + \frac{2}{(m^2(\lambda, t) + 1)^2} \right), \quad (11)$$

где  $m(\lambda, t) = n_s(\lambda)/n_1(\lambda, t)$  – относительный показатель преломления рассеивающих частиц, определяемый с использованием уравнений (7) и (9);  $x(\lambda, t) = 2\pi a n_1(\lambda, t)/\lambda$  – относительный размер рассеивателей.

Значение объемной доли рассеивателей  $\varphi_{s0}$  в начальный момент времени было получено из начального веса и объема исследуемых образцов с использованием соотношения

$$\begin{cases} W_s + W_{ICF} = W_0 \\ V_s + V_{ICF} = V_0 \end{cases} = \begin{cases} V_s \rho_s + V_{ICF} \rho_{ICF} = W_0 \\ V_s + V_{ICF} = V_0 \end{cases}, \quad (12)$$

где  $W_s$  – вес рассеивателей кожи,  $W_{ICF}$  – вес внутритканевой жидкости кожи,  $V_s$  – объем занимаемый рассеивателями кожи,  $V_{ICF}$  – объем занимаемый внутритканевой жидкостью кожи,  $W_0$  и  $V_0$  – вес и объем образца, измеренные при  $t = 0$ ,  $\rho_s = 1.41$  г/мл [36, 37], и  $\rho_{ICF} \approx 1$  г/мл – плотность рассеивателей и внутритканевой жидкости кожи. Из уравнения (12) следует, что  $V_s = V_0 - \frac{V_0 \rho_s - W_0}{\rho_s - \rho_{ICF}}$  и  $\varphi_{s0} = V_s/V_0$ . Измеренные значения  $\varphi_{s0}$  лежат в пределах от 0.2 до 0.25.

Изменение толщины  $l(t)$  и площади  $S(t)$  образцов кожи было использовано для учета изменения в процессе просветления объемной доли рассеивателей  $\varphi_s(t)$ :  $\varphi_s(t) = \varphi_{s0} V_0/V(t)$ , где  $V_0 = S_0 l_0$  и  $V(t) = S(t)l(t)$ .

Оценка эффективных размеров рассеивателей кожи выполнялась на основе измерений коллимированного пропускания  $T(t = 0)$  в начальный момент времени. Поскольку

$$\mu_{s0} = -\frac{\ln(T(t = 0))}{l_0} - \mu_{a0}, \quad (13)$$

где  $\mu_{a0}$  – коэффициент поглощения нативной кожи [38],  $\mu_{s0}$  – коэффициент рассеяния в начальный момент времени,  $l_0$  – начальная толщина образца, то средний диаметр коллагеновых волокон оценивался из начального значения коэффициента рассеяния с помощью уравнений (10) и (11). Средний диаметр  $2a$  для разных образцов составлял 80–150 нм, что хорошо согласуется со значениями диаметра коллагеновых волокон кожи человека (40–150 нм), полученных с помощью электронной микроскопии [39]. При проведении вычислений предполагалось, что под действием ПЭГ за время проведения измерений диаметр рассеивателей кожи не изменяется.

Для анализа кинетики изменения веса  $W(t)$ , толщины  $l(t)$ , площади  $S(t)$  и объема  $V(t)$  образцов кожи использовалось следующее уравнение:

$$\frac{A(t)}{A(t = 0)} = B \exp(-t/\tau) + B_0, \quad (14)$$

где  $A(t = 0)$  – измеренное в начальный момент времени значение толщины, площади или веса образца (объем определялся как произведение площади на толщину),  $\tau$  – характеристическое время дегидратации,  $B$  – коэффициент, характеризующий степень дегидратации, и  $B_0$  характеризует остаточное значение веса, площади, толщины или объема образца после дегидратации.

Изменение коэффициента поглощения  $\mu_a(t)$  учитывалось с помощью уравнения

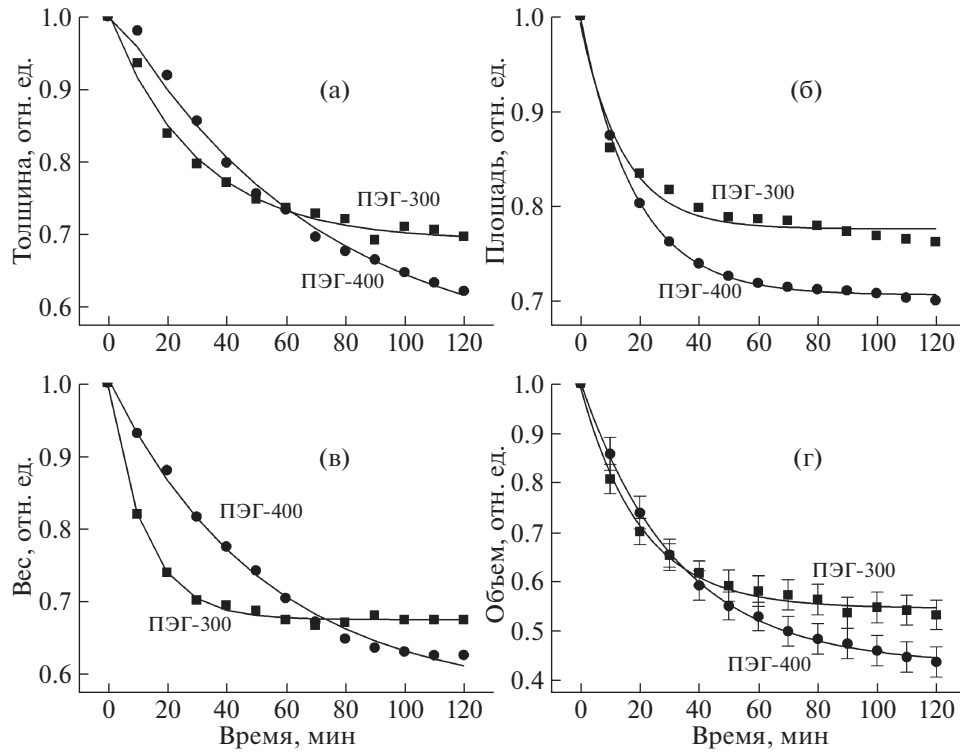
$$\mu_a(t) = \varphi_s(t) \sigma_{a0} / \pi a^2, \quad (15)$$

где  $\sigma_{a0}$  – поперечное сечение поглощения, которое определялось из значений  $\mu_{a0}$  и  $\varphi_{s0}$ .

Зависимость от времени коэффициента коллимированного пропускания образца кожи, помещенного в ПА, имеет вид

$$T_c(t) = \exp[-(\mu_a(t) + \mu_s(t))l(t)]. \quad (16)$$

Уравнения (1)–(16) формируют прямую задачу, т.е. определяют зависимость коэффициента коллимированного пропускания от концентрации раствора ПА внутри образца кожи. Обратная задача заключается в восстановлении значения коэффициента диффузии по временной зависимости коллимированного пропускания. Решение задачи требует минимизации целевого функционала:



**Рис. 3.** Кинетика изменения толщины (а), площади (б), веса (в) и объема (г) образцов кожи. Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошная линия – аппроксимации согласно уравнению (14). Параметры аппроксимации представлены в табл. 3.

$$f(D) = \sum_{i=1}^{N_t} (T_c(D, t_i) - T_c^*(t_i))^2,$$

где  $N_t$  – общее количество экспериментальных точек, полученное при регистрации временной зависимости коллимированного пропускания на фиксированной длине волны;  $T_c(D, t)$  – значение коэффициента пропускания, рассчитанное с помощью уравнения (16) в момент времени  $t$  при заданном значении  $D$ ;  $T_c^*(t)$  – экспериментально измеренное значение коэффициента пропускания в момент времени  $t$ . Минимизация выполнялась с помощью симплекс-метода, подробно описанного в работе [40].

Нужно отметить, что в уравнении (16) коэффициенты поглощения и рассеяния принимаются пространственно однородными для каждого момента времени. Это допущение справедливо, поскольку в ходе измерений коэффициент ослабления автоматически усредняется вдоль коллимированного пучка света, пересекающего образец. Таким образом, измеренная кинетика описывает поведение пространственно усредненного коэффициента ослабления с преобладанием в нем коэффициента рассеяния ( $\mu_a \ll \mu_s$ ).

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 представлена кинетика изменения веса, толщины, площади и объема образцов кожи, помещенных в ПЭГ-300 и ПЭГ-400. Экспериментальные данные нормировались на значения, измеренные в начальный момент времени, усреднялись по всем образцам, после чего аппроксимировались уравнением (14). Из рис. 3а–3г видно, что в обоих случаях происходит уменьшение всех измеренных параметров: через 120 мин дегидратации вес образцов под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400 уменьшился приблизительно на 32 и 37%, толщина – на 30 и 38%, площадь – на 24 и 30% и объем образцов – на 47 и 56%.

Результаты анализа кинетики дегидратации с использованием уравнения (14) представлены в табл. 3. Из рис. 3 и табл. 3 видно, что ПЭГ-300 и ПЭГ-400, несмотря на схожесть этих веществ, оказывают разное влияние на степень дегидратации кожи. За общее время измерений (порядка 2 ч) ПЭГ-400 вызывает более сильную дегидратацию кожи, в то время как ПЭГ-300 наиболее эффективен в течении первых 30 мин воздействия (рис. 3а, 3в и 3г), что связано с его меньшей вязкостью и большим осмотическим давлением. Данный результат хорошо коррелирует с данными работы [41], в которой на примере дегидратации свиной кожи ПЭГ-200 и ПЭГ-400 было пока-

**Таблица 3.** Параметры дегидратации кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400

Параметр дегидратации		Просветляющий агент	
		ПЭГ-300	ПЭГ-400
Вес/Дегидратация	$B^W$	$0.32 \pm 0.01$	$0.43 \pm 0.01$
	$\tau^W$ , мин	$12.5 \pm 0.4$	$52.1 \pm 4.1$
	$B_0^W$	$0.68 \pm 0.01$	$0.57 \pm 0.01$
Толщина/‘Поперечное сжатие’	$B^l$	$0.31 \pm 0.01$	$0.47 \pm 0.03$
	$\tau^l$ , мин	$29.4 \pm 3.5$	$68.5 \pm 9.6$
	$B_0^l$	$0.69 \pm 0.01$	$0.53 \pm 0.03$
Площадь/Продольное сжатие	$B^S$	$0.22 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.01$
	$\tau^S$ , мин	$14.5 \pm 1.8$	$18.2 \pm 0.48$
	$B_0^S$	$0.78 \pm 0.01$	$0.71 \pm 0.01$
Объем/Дегидратация	$B^V$	$0.45 \pm 0.01$	$0.57 \pm 0.01$
	$\tau^V$ , мин	$20.3 \pm 1.2$	$32.5 \pm 0.8$
	$B_0^V$	$0.55 \pm 0.01$	$0.43 \pm 0.01$

зано, что в первые полчаса дегидратации ПЭГ-200 вызывает большую дегидратацию кожи по сравнению с ПЭГ-400. Кроме того, в начальный период времени процесс дегидратации под действием ПЭГ-300 происходит с большей скоростью, чем под действием ПЭГ-400. Существенные различия наблюдаются и при сравнении величины и скорости продольного и поперечного сжатия образцов, что связано со структурой кожи, в которой коллагеновые и эластиновые волокна, составляющие ее каркас, расположены параллельно поверхности кожи. Видно, что если продольное сжатие образцов кожи практически прекращается примерно через час воздействия как для ПЭГ-300, так и для ПЭГ-400, то поперечное сжатие продолжается в течение всех двух часов измерений, что особенно заметно для ПЭГ-400. Очевидно, что уменьшение длины волокон менее выражено по сравнению с уменьшением внутритканевого пространства между ними вследствие осмотической дегидратации ткани.

Несмотря на то, что в целом ПЭГ-400 вызывает более выраженное уменьшение объема образцов кожи, различие в скоростях сжатия для ПЭГ-300 и ПЭГ-400 приводит к тому, что ПЭГ-300 в течении первых 30 мин вызывает большее уменьшение объема по сравнению с ПЭГ-400.

Таким образом, можно заключить, что дегидратация кожи под действием ПЭГ-300 происходит быстрее по сравнению с ПЭГ-400, что объясняется меньшей вязкостью и большим осмотическим давлением ПЭГ-300, в то время как степень дегидратации под действием ПЭГ-400 больше по

сравнению с ПЭГ-300. Меньшая степень дегидратации кожи под действием ПЭГ-300, по-видимому, связана с ослаблением гигроскопичности при увеличении молекулярного веса ПЭГ, т.е. проникая вглубь кожи, ПЭГ-300 в силу его большей гигроскопичности [18, 19] более эффективно связывает внутритканевую воду и останавливает процесс осмотической дегидратации.

На рис. 4 и 5 представлены типичные спектры и кинетика изменения коллимированного пропускания образцов кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в диапазоне 500–900 нм в течение 2 ч. Из рис. 4 видно, что в начальный момент времени кожа представляет собой среду, практически непрозрачную в видимой и ближней ИК областях спектра. По мере проникновения ПА во внутритканевую жидкость и одновременной дегидратации кожи наблюдается уменьшение рассеяния и соответственно увеличение коллимированного пропускания образцов. Видно, что оптическое просветление образцов кожи происходит во всем исследуемом диапазоне длин волн. На рис. 5 хорошо видно, что рост коллимированного пропускания наблюдается в основном в течение первых 60–70 мин измерений. Затем процесс стабилизируется, и начиная примерно с 80–90-й минуты просветления кожи существенного увеличения величины коллимированного пропускания не наблюдается.

Степень оптического просветления является одним из важнейших параметров, характеризующих сравнительную эффективность и практическую ценность различных просветляющих аген-

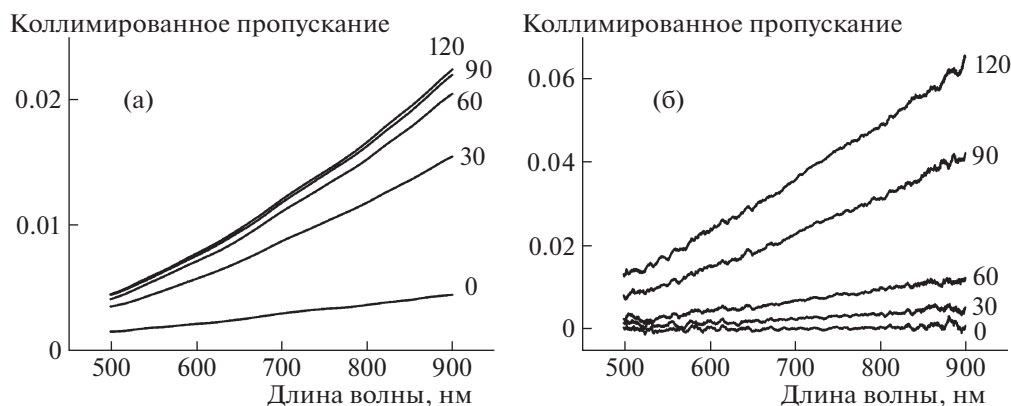


Рис. 4. Типичные спектры коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo*, измеренные в различные моменты времени после их помещения в ПЭГ-300 (а) и в ПЭГ-400 (б).

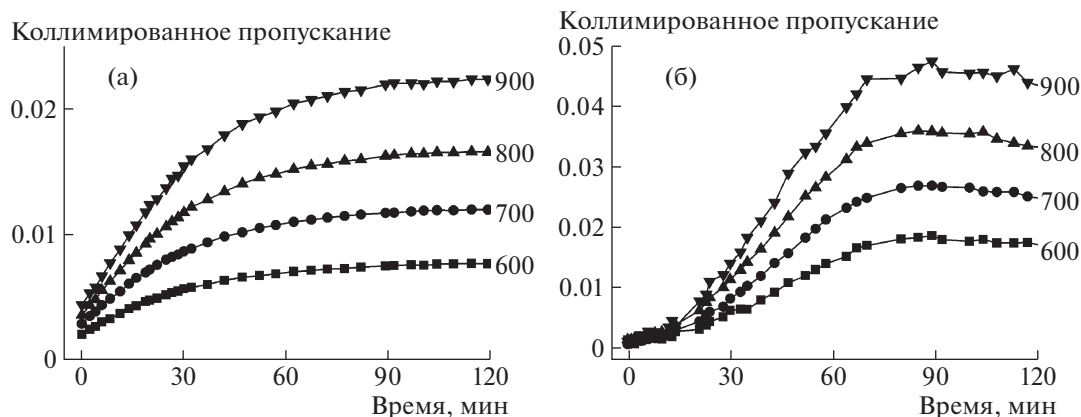


Рис. 5. Типичная кинетика изменения коэффициента коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo* под действием ПЭГ-300 (а) и ПЭГ-400 (б), измеренная на нескольких длинах волн.

тов. Степень (эффективность) оптического просветления кожи оценивалась в трех спектральных диапазонах с помощью выражения:  $OC_{ef} = \frac{\mu_{s0} - \mu_s(t)}{\mu_{s0}}$ , где  $\mu_{s0}$  – коэффициент рассеяния в начальный момент времени,  $\mu_s(t)$  – значение коэффициента рассеяния в момент времени  $t$  оптического просветления кожи. Полученные результаты представлены в табл. 4.

Из таблицы хорошо видно, что эффективность оптического просветления растет с увеличением длины волны, увеличиваясь, например, с  $0.16 \pm 0.12$  (в диапазоне 600–700 нм) до  $0.21 \pm 0.15$  (в диапазоне 800–900 нм) через 10 мин после начала воздействия для ПЭГ-300 или с  $0.31 \pm 0.14$  (в диапазоне 600–700 нм) до  $0.36 \pm 0.11$  (в диапазоне 800–900 нм) через 60 мин после начала воздействия для ПЭГ-400. Такое поведение объясняется тем, что с ростом длины волны уменьшается различие между значениями показателя преломле-

ния рассеивателей кожи (9) и значениями показателя преломления внутритканевой жидкости (8).

Сравнение между собой эффективности оптического просветления, вызванного ПЭГ-300 и ПЭГ-400, показывает, что в течение первых тридцати минут  $OC_{ef}$  для ПЭГ-300 больше, чем для ПЭГ-400. Это объясняется тем, что в начальный период времени функция  $\frac{\varphi_s(t)(1 - \varphi_s(t))^3}{1 + \varphi_s(t)}$ , так называемый фактор упаковки рассеивателей (см. (10)), принимает меньшие значения при использовании ПЭГ-300 по сравнению с ПЭГ-400. Поскольку в начальный период времени концентрация пропиленгликоля в коже относительно невелика, т.е. сечение рассеяния меняется незначительно, то оптическое просветление в основном определяется дегидратационным механизмом. Полученные результаты хорошо коррелируют с данными работы [14], в которой было



**Таблица 4.** Степень оптического просветления кожи под действием ПЭГ-300 и ПЭГ-400

Время измерения, мин	Спектральный диапазон					
	600–700 нм		700–800 нм		800–900 нм	
	ПЭГ-300	ПЭГ-400	ПЭГ-300	ПЭГ-400	ПЭГ-300	ПЭГ-400
5	0.11 ± 0.09	0.07 ± 0.07	0.11 ± 0.10	0.06 ± 0.06	0.14 ± 0.12	0.07 ± 0.04
10	0.16 ± 0.12	0.10 ± 0.08	0.18 ± 0.13	0.12 ± 0.11	0.21 ± 0.15	0.12 ± 0.09
15	0.19 ± 0.13	0.16 ± 0.12	0.24 ± 0.15	0.19 ± 0.16	0.27 ± 0.17	0.17 ± 0.13
30	0.24 ± 0.15	0.24 ± 0.16	0.28 ± 0.15	0.28 ± 0.18	0.32 ± 0.18	0.28 ± 0.16
60	0.27 ± 0.15	0.31 ± 0.14	0.32 ± 0.16	0.35 ± 0.12	0.35 ± 0.17	0.36 ± 0.11
120	0.28 ± 0.13	0.37 ± 0.15	0.32 ± 0.13	0.40 ± 0.11	0.36 ± 0.14	0.42 ± 0.10

показано увеличение эффекта просветления с ростом молекулярного веса ПЭГ.

Оценка коэффициента диффузии ПЭГ в коже была выполнена на основе анализа кинетики изменения коллимированного пропускания кожи крысы *ex vivo* с использованием алгоритма, представленного в разд. 1.4 с учетом кинетики изменения структурных и геометрических параметров кожи. Измеренные значения коэффициента диффузии составили  $(1.83 \pm 2.22) \times 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с для ПЭГ-300 и  $(1.70 \pm 1.47) \times 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с для ПЭГ-400. Полученное значение коэффициента диффузии ПЭГ-300 в коже больше по сравнению с коэффициентом диффузии ПЭГ-400, причем соотношение коэффициентов диффузии ПЭГ-300/ПЭГ-400 хорошо согласуется с данными по их диффузии в воде [27]:  $5.08 \times 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с (для ПЭГ-300) и  $4.45 \times 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с (для ПЭГ-400) и значениями коэффициентов диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в роговом слое эпидермиса кожи [20]:  $(4.5 \pm 2.9) \times 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/ч (для ПЭГ-300) и  $(3.7 \pm 2.5) \times 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/ч (для ПЭГ-400), что при пересчете составляет  $\sim 1.25 \times 10^{-12}$  см<sup>2</sup>/с (для ПЭГ-300) и  $\sim 1.03 \times 10^{-12}$  см<sup>2</sup>/с (для ПЭГ-400), что обусловлено различиями в гидродинамическом радиусе диффундирующих молекул и особенностями строения рогового слоя и дермы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают эффективность применения ПЭГ в качестве просветляющего агента для управления рассеивающими характеристиками кожи. В частности, наблюдаются увеличение пропускания коллимированного излучения через кожу в спектральном диапазоне 500–900 нм, уменьшение скорости диффузии ПЭГ, увеличение эффективности оптического просветления кожи, а также усиление поперечного сжатия кожи с увеличением молекулярного веса ПЭГ. Измеренные значения коэффициентов диффузии ПЭГ-300 и ПЭГ-400 в коже крысы *ex*

*vivo* составили соответственно  $(1.83 \pm 2.22) \times 10^{-6}$  и  $(1.70 \pm 1.47) \times 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-15-00186.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зимняков Д.А., Тучин В.В. // Квант. электрон. 2002. Т. 32. № 10. С. 849.
2. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М.: Физмалит, 2010. 488 с.
3. Тучин В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике. М.: Физмалит, 2012. 812 с.
4. Tuchin V.V. // Laser Physics. 2005. V. 15. № 8. P. 1109.
5. Genina E.A., Bashkatov A.N., Tuchin V.V. // Expert Review of Medical Devices. 2010. V. 7. № 6. P. 825.
6. Zhu D., Larin K., Luo Q., Tuchin V.V. // Laser & Photon. Rev. 2013. V. 7. № 5. P. 732.
7. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Yanina I.Yu., Tuchin V.V. // J. Biomed. Photon. & Engin. 2015. V. 1. № 1. P. 22.
8. Rylander C.G., Stumpp O.F., Milner T.E., Kemp N.J., Mendenhall J.M., Diller K.R., Welch A.J. // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11. № 4. P. 041117.
9. Yeh A.T., Hirshburg J. // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11. № 1. P. 014003.
10. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V.V., Zhu D. // J. Biophoton. 2010. V. 3. № 1–2. P. 44.
11. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. // Опт. и спектр. 2010. Т. 109. № 2. С. 256.
12. Wang J., Ma N., Shi R., Zhang Y., Yu T., Zhu D. // IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics. 2014. V. 20. № 2. P. 7101007.
13. Liu Y., Yang X., Zhu D., Luo Q. // Opt. Lett. 2013. V. 38. № 20. P. 4236.
14. Mao Z., Zhu D., Hu Y., Wen X., Han Z. // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13. № 2. P. 021104.
15. Ding Y., Wang J., Fan Z., Wei D., Shi R., Luo Q., Zhu D., Wei X. // Biomed. Opt. Expr. 2013. V. 4. № 11. P. 2518.
16. Zhong H., Guo Z., Wei H., Guo L., Wang C., He Y., Xiong H., Liu S. // Photochem. Photobiol. 2010. V. 86. P. 732.

17. *Genina E.A., Bashkatov A.N., Kolesnikova E.A., Bas-ko M.V., Terentyuk G.S., Tuchin V.V.* // J. Biomed. Opt. 2014. V. 19. № 2. P. 021109.
18. *Gao J.K.* Polyethylene Glycol as an Embedment for Microscopy and Histochemistry. CRC Press, 1993. 141 p.
19. Handbook of pharmaceutical excipients / Ed. by Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 888 p.
20. *Jakasa I., Verberk M.M., Esposito M., Bos J.D., Kezic S.* // J. Invest. Dermatol. 2007. V. 127. P. 129.
21. *Hamalainen K.M., Kontturi K., Auriola S., Murtomaki L., Urtti A.* // J. Controlled Release. 1997. V. 49. P. 97.
22. *Weng L., Liang S., Zhang L., Zhang X., Xu J.* // Macromolecules. 2005. V. 38. № 12. P. 5236.
23. *Gursahani H., Riggs-Sauthier J., Pfeiffer J., Lechuga-Ballesteros D., Fishburn C.S.* // J. Pharmaceutical Sci. 2009. V. 98. № 8. P. 2847.
24. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/81160?lang=en&region=RU>
25. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/81170?lang=en&region=RU>
26. *Money N.P.* // Plant Physiology. 1989. V. 91. P. 766.
27. *Johansson L., Skantze U., Lofroth J.-E.* // Macromolecules. 1991. V. 24. P. 6019.
28. *Schiebener P., Straub J., Sengers J.M.H.L., Gallagher J.S.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1990. V. 19. № 3. P. 677.
29. *Tuchin V.V.* Optical Clearing of Tissues and Blood. PM 154, Bellingham: SPIE Press, 2005. 254 p.
30. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V.* // Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by Tuchin V.V., Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009. P. 587–621.
31. *Leonard D.W., Meek K.M.* // Biophys. J. 1997. V. 72. № 3. P. 1382.
32. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V.* // J. Innovative Optical Health Sciences. 2011. V. 4. № 1. P. 9.
33. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Tuchin V.V.* // Biophysical J. 2003. V. 85. № 5. P. 3310.
34. *Schmitt J.M., Kumar G.* // Appl. Opt. 1998. V. 37. № 13. P. 2788.
35. *Bohren C.F., Huffman D.R.* Absorption and scattering of light by small particles. N.Y.: John Willey & Sons Inc., 1983. 530 p.
36. *Huang Y., Meek K.M.* // Biophysical J. 1999. V. 77. P. 1655.
37. *Fischer H., Polikarpov I., Craievich A.F.* // Protein Science. 2004. V. 13. P. 2825.
38. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Korovina I.V., Kochubey V.I., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V.* // Proc. SPIE. 2000. V. 4224. P. 300.
39. *Linares H.A., Kischer C.W., Dobrkovsky M., Larson D.L.* // J. Invest. Dermatol. 1972. V. 59. № 4. P. 323.
40. *Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P.* Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1992. 994 p.
41. *Yu T., Wen X., Tuchin V.V., Luo Q., Zhu D.* // J. Biomed. Opt. 2011. V. 16. № 9. P. 095002.