

<https://doi.org/10.25208/0042-4609-2019-95-1-21-29>

Адресная доставка фотосенсибилизатора для фотохимиотерапии витилиго

Утц С. Р.¹, Сухоруков Г. Б.², Тучин В. В.^{3,4}, Горин Д. А.³, Генина Э. А.^{3,4}, Свенская Ю. И.^{3,*}, Тальникова Е. Е.¹

¹ Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
Министерства здравоохранения Российской Федерации

410012, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

² Лондонский университет Королевы Марии
E14NS, United Kingdom, London, Mile End Road

³ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
410012, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

⁴ Национальный исследовательский Томский государственный университет
634050, Российская Федерация, г. Томск, просп. Ленина, д. 36

Цель: разработка эффективного способа доставки фотосенсибилизатора *Ammi majus fructuum furocumarines* (AMFF) в волосяные фолликулы с последующим применением УФА-облучения ($\lambda = 320\text{--}400$ нм).

Материалы и методы. Предлагаемый способ доставки заключается в применении частиц карбоната кальция, выступающих в роли контейнера-носителя AMFF. Исследование заполнения волосяных фолликулов было проведено *in vivo* методом оптической когерентной томографии, а также путем экстракции волос с последующим исследованием методом лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии. Регистрация характера пигментации кожи 3 здоровых добровольцев после сеанса УФА-облучения участков с предварительным внедрением препарата AMFF в свободном и иммобилизованном виде была осуществлена методом дерматоскопии.

Результаты. Продемонстрировано обильное заполнение волосяных фолликулов частицами карбоната кальция, доказана возможность интрафолликулярной доставки фотосенсибилизатора с их помощью. Установлено, что в результате УФА-облучения в месте внедрения контейнеров, нагруженных AMFF, происходит значительное накопление пигмента.

Заключение. Предложенный способ адресной доставки фотосенсибилизатора позволяет оптимизировать методику фотохимиотерапевтического воздействия.

Ключевые слова: адресная доставка лекарств, трансдермальный перенос, фотохимиотерапия, карбонат кальция, контейнер-носитель

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Для цитирования: Утц С. Р., Сухоруков Г. Б., Тучин В. В., Горин Д. А., Генина Э. А., Свенская Ю. И., Тальникова Е. Е. Адресная доставка фотосенсибилизатора для фотохимиотерапии витилиго. Вестник дерматологии и венерологии. 2019;95(1):21–29. <https://doi.org/10.25208/0042-4609-2019-95-1-21-29>



Targeted photosensitizer delivery: A prospective approach to vitiligo photochemotherapy

Sergey R. Utz¹, Gleb B. Sukhorukov², Valery V. Tuchin^{3,4}, Dmitry A. Gorin³, Elina A. Genina^{3,4}, Yuliya I. Svenskaya^{3,*}, Ekaterina E. Talnikova¹

¹ Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation
Bolshaya Kazachya str., 112, Saratov, 410012, Russian Federation

² Queen Mary University of London
Mile End Road, London, E14NS, United Kingdom

³ Saratov State University
Astrakhanskaya str., 83, Saratov, 410012, Russian Federation

⁴ National Research Tomsk State University
Lenina prospect, 36, Tomsk, 634050, Russian Federation

Aim. In this work, the authors set out to develop an effective method for the intrafollicular delivery of “*Ammi majus fructuum furocumarines*” photosensitizer (AMFF) followed by UVA irradiation ($\lambda = 320\text{--}400\text{ nm}$).

Materials and methods. The proposed delivery method consists in using calcium carbonate particles acting as AMFF carriers. *In vivo* monitoring of hair follicle filling was carried out via optical coherence tomography, as well as by means of analyzing epilated hair using confocal laser scanning microscopy. Following the administration of free and encapsulated AMFF to three healthy volunteers, the character of UVA-induced skin pigmentation was registered under dermatoscopic examination.

Results. The obtained results demonstrate a profuse filling of hair follicles with calcium carbonate particles, thus confirming the possibility of intrafollicular photosensitizer delivery. It was established that exposure to UVA irradiation causes intense pigment accumulation in the area of AMFF carrier administration.

Conclusion. The proposed method of the targeted photosensitizer delivery allows photochemical therapy to be improved.

Keywords: targeted drug delivery, transdermal delivery route, photochemical therapy, calcium carbonate, carriers

Conflict of interest: the authors state that there is no potential conflict of interest requiring disclosure in this article.

For citation: Utz S. R., Sukhorukov G. B., Tuchin V. V., Gorin D. A., Genina E. A., Svenskaya Y. I., Talnikova E. E. Targeted photosensitizer delivery: A prospective approach to vitiligo photochemotherapy. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2019;95(1):21–29. <https://doi.org/10.25208/0042-4609-2019-95-1-21-29>

Введение

Витилиго (В) — хроническое заболевание, клиническим проявлением которого является формирование на коже и ее производных, а также слизистых оболочках депигментированных пятен различной формы и размера, возникающих вследствие разрушения и снижения количества меланоцитов. Популяционная частота В достигает 2 % [1, 2]. Для лечения В предложены различные методы, каждый из которых обладает совокупностью достоинств и недостатков. Одним из наиболее эффективных способов является фототерапия: узкополосная средневолновая ультрафиолетовая терапия (NB-UVB), фотохимиотерапия с использованием в качестве фотосенсибилизаторов соединений фурукумаринового ряда (псораленов) в комбинации с УФА излучением (PUVA-терапия) и эксимерное лазерное излучение ($\lambda = 308$ нм) [2], однако каждый из обсуждаемых методов имеет ряд побочных эффектов. К наиболее часто наблюдаемым относят широкий спектр местных реакций (зуд, эритема, чувство жжения, ксероз и др.) и нарушение общего состояния (лихорадка, астения, диспепсические явления). Возможны и более грозные осложнения: фотостарение кожи и канцерогенез. Учитывая возможность развития кумулятивных эффектов, важную роль играет тщательно выполняемая дозиметрия ультрафиолетового излучения и строгое соблюдение рекомендованных схем проведения фототерапии [3, 4]. Таким образом, современное состояние проблемы в области лечения витилиго диктует необходимость проведения исследований по оптимизации терапии данного дерматоза.

В последние десятилетия активно исследуется возможность применения наночастиц для трансдермального переноса лекарственных препаратов при их наружном нанесении с целью улучшения их проникающей способности и адресной доставки [5]. Особое внимание уделяется транспортировке через придатки кожи: волосяные воронки и фолликулы, протоки сальных и потовых желез [6, 7]. Адресная доставка лекарственных веществ в пространство сально-волосяного фолликула способна сыграть особую роль в лечении В, поскольку открывает возможность локализации терапевтического воздействия препарата именно в зоне сосредоточения стволовых клеток меланоцитов [8–10]. Применение матриц-носителей для инкапсуляции лекарственной суспензии играет ключевую роль в обеспечении ее эффективной трансфолликулярной доставки. Физико-химические параметры таких носителей оказывают большое влияние на глубину и обильность заполнения фолликулов [5, 11, 12].

Целью данной работы явилась разработка эффективного метода доставки препарата AMFF в волосяные фолликулы с последующим облучением УФА ($\lambda = 320–400$ нм). Такой метод терапии основан на применении пористых матриц-носителей, обеспечивающих инкапсуляцию фотосенсибилизатора с возможностью его доставки в волосяные фолликулы.

Материалы и методы

Синтез и параметры частиц-контейнеров

Для приготовления частиц кальция карбоната (CaCO_3), выступающих в роли контейнера-носителя лекарственной композиции, были использованы соли карбоната натрия и хлорида кальция (Sigma-Aldrich Chemie, Германия). Синтез осуществлялся по методи-

ке, описанной в работе [13], все реакционные растворы были простерилизованы. Приготовленные частицы были выдержаны в 95 % этиловом спирте и высушены в асептических условиях при температуре 60 °С.

Иммобилизация фотосенсибилизатора AMFF («Амифуруин», «Вилар», Россия) в полученные контейнеры осуществлялась методом его адсорбции из раствора [14]. Для этого навеска сухих частиц карбоната кальция была диспергирована в растворе иммобилизуемого вещества и выдержана в нем в течение 30 минут при непрерывном встряхивании с помощью шейкера TS-100 (Biosan, Латвия). Затем осадок частиц был однократно промыт раствором этилового спирта и высушен в асептических условиях при температуре 37 °С.

Исследование морфологии полученных структур осуществлялось методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе MIRA II LMU (Tescan) со сканирующим электронным микроскопом XL 30 ESEM FEG (Philips). Оптическое исследование процесса иммобилизации AMFF в CaCO_3 -контейнеры было проведено методом флуоресцентной микроскопии на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Великобритания). Препарат обладает выраженной флуоресценцией с максимумом на $\lambda = 460$ нм при возбуждении светом с длиной волны $\lambda = 405$ нм. Количественное определение эффективности загрузки препарата осуществлялось путем исследования спектров флуоресценции исходного раствора и собранных в процессе загрузки частиц надосадочных жидкостей с помощью многофункционального гибридного фотометра для микропланшетов Synergy H1 (BioTek, США).

Исследование внедрения частиц карбоната кальция в волосяные фолликулы *in vivo*

Визуализация и изучение состояния волосяных фолликулов *in vivo* осуществлялось методом оптической когерентной томографии (ОКТ) с помощью установки для спектральной ОКТ OCP930SR (Thorlabs, США) со следующими параметрами: центральная длина волны излучения 930 ± 5 нм, ширина полосы излучения 100 ± 5 нм, длина области сканирования 6 мм, аксиальное и латеральное разрешение на воздухе 6,2 и 9,6 мкм соответственно.

Интрафолликулярное внедрение матриц-носителей осуществлялось путем аппликации суспензии частиц на поверхность кожи с последующей обработкой зоны нанесения низкоинтенсивным терапевтическим ультразвуком УЗТ-1.01Ф («МедТеКо», Россия) частотой 0,88 МГц и интенсивностью $0,4 \text{ Вт/см}^2$ с целью увеличения трансдермального переноса суспензии.

Исследование заполнения волосяных фолликулов после внедрения частиц CaCO_3 , нагруженных AMFF, осуществлялось *in vivo* методом ОКТ, а также путем экстракции не менее 10 волос с последующим исследованием флуоресцентного сигнала от них методом конфокальной флуоресцентной микроскопии (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Великобритания) при возбуждении лазером с длиной волны $\lambda = 405$ нм.

Схема эксперимента

Исследование проводилось *in vivo* на внешней стороне предплечья 3 здоровых добровольцев женского пола в возрасте 25–26 лет, с 1–2 фототипом кожи (по

Фитцпатрику) [15]. Изучался характер пигментации кожи после сеанса УФА-облучения с помощью люминесцентной лампы мощностью 9 Вт (METEC-SUNNY 2000, Германия). С целью дифференциации эффекта, связанного с применением нагруженных препаратом частиц, от стандартного PUVA-эффекта, а также с целью исключения возможного эффекта от применения самой матрицы и ультразвукового воздействия на предплечьях добровольца были выбраны 5 зон. В *зоне 1* осуществлялась аппликация суспензии ненагруженных частиц CaCO_3 , в *зоне 2* — нагруженных AMFF частиц, в *зоне 3* осуществлялось нанесение свободного раствора AMFF. Навеска ненагруженных и нагруженных AMFF частиц карбоната кальция массой 30 мг диспергировалась в 100 мкл 70 % этилового спирта. Нагрузка частиц действующим веществом составляла 1 % массовой (что соответствует аппликации 0,3 мг AMFF в зоне 2). При нанесении раствора фотосенсибилизатора в свободном виде осуществлялась аппликация 3 мг AMFF. Для усиления трансдермального переноса лекарственной суспензии было осуществлено воздействие при помощи низкоинтенсивного терапевтического ультразвука УЗТ-1.01Ф («МедТeКо», Россия) с частотой 0,88 МГц и интенсивностью 0,4 Вт/см². По завершении процедуры избыток частиц и фотосенсибилизатора был тщательно смыт с поверхности кожи ватным тампоном. *Зоны 4 и 5* были выбраны контрольными, без аппликации частиц и препарата, однако в зоне 4 осуществлялось ультразвуковое воздействие при тех же параметрах, что и в зонах 1–3. Далее осуществлялось облучение УФА всех исследуемых зон в течение 2,5 минуты.

Дерматоскопическое исследование проводилось на аппарате Soft Plus (Callegari, Италия) при увеличении $\times 400$. С помощью этой же многофункциональной дерматологической установки был измерен индекс пигментации в исследуемых участках.

Создание макро- и микроизображений производилось компетентным практикующим врачом, чтобы избежать диверсификации во время процедуры. Анализ данных был выполнен двумя независимыми специалистами.

Результаты и их обсуждение

Пористые частицы карбоната кальция являются перспективными матричными контейнерами для иммобилизации биологически активных веществ. Данные частицы обладают рядом таких достоинств, как биосовместимость, мягкие условия разрушения (растворение при $\text{pH} < 6,5$), простота приготовления и низкая себестоимость [16]. Возможность использования CaCO_3 -контейнеров для инкапсуляции лекарственных средств обусловлена низкой цитотоксичностью карбоната кальция и отсутствием его влияния на жизнеспособность клеточных культур, а также эффективностью их применения в качестве контейнеров для внутриклеточной доставки [17, 18]. Было показано, что использование таких частиц для инкапсуляции лекарственного соединения усиливает терапевтический эффект от его применения благодаря повышению локальной концентрации действующего вещества, доставляемого внутрь клетки.

СЭМ-изображения частиц карбоната кальция, предлагаемых для использования в качестве контейнера-носителя лекарственного вещества, приведены

на рис. 1, средний размер полученных контейнеров составил $0,7 \pm 0,2$ мкм.

Частицы обладают пористой структурой (рис. 1б), что определяет высокую эффективность включения лекарственных форм в их объем, а также обуславливает развитость поверхности, увеличивая ее адсорбционную емкость [16, 19].

Инкапсуляция препарата AMFF была осуществлена методом его адсорбции из раствора, СЭМ- и флуоресцентное изображение нагруженных препаратом частиц приведены на рис. 2 (а и б соответственно). По сравнению с ненагруженными матрицами данные частицы имели более гладкую поверхность (рис. 2а), а также обладали выраженной флуоресценцией при возбуждении лазером с $\lambda = 405$ нм (рис. 2б), что свидетельствует об успешности включения в них фотосенсибилизатора.

Спектрофлуориметрическое исследование показало, что эффективность загрузки AMFF в контейнеры, представляющая собой отношение массы загруженного действующего вещества к массе частиц, выраженное в процентах, составила 1 %.

Разработка эффективного метода доставки AMFF с помощью пористых CaCO_3 -матриц-носителей в волосяные фолликулы для последующего проведения фотохимиотерапии является перспективной задачей в рамках оптимизации методики лечения витилиго. В связи с этим было проведено исследование возможности внедрения полученных контейнеров в волосяные фол-

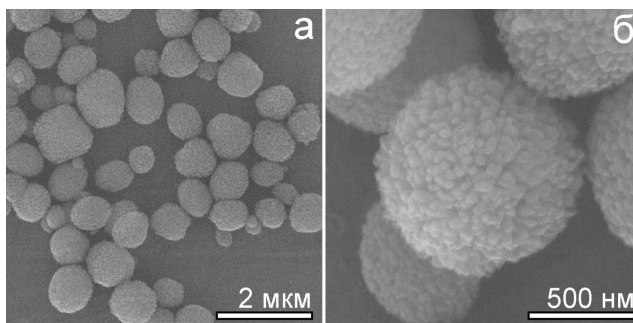


Рис. 1. Изображения ненагруженных частиц карбоната кальция, полученные методом сканирующей электронной микроскопии при различных увеличениях
Fig. 1. Images of non-loaded calcium carbonate particles obtained by scanning electron microscopy at various magnifications

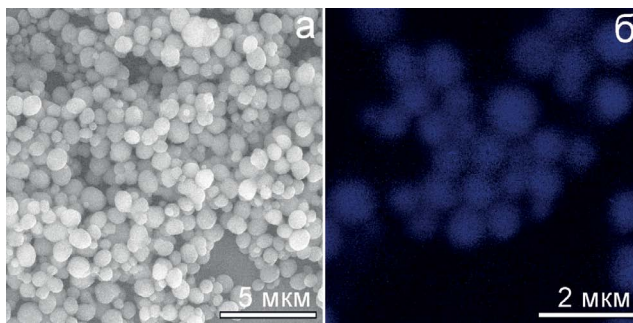


Рис. 2. Изображения частиц карбоната кальция, содержащих препарат AMFF, полученные методом сканирующей электронной (а) и флуоресцентной конфокальной микроскопии (б)
Fig. 2. Images of calcium carbonate particles containing the AMFF composition, obtained by scanning electron (a) and fluorescent confocal microscopy (b)

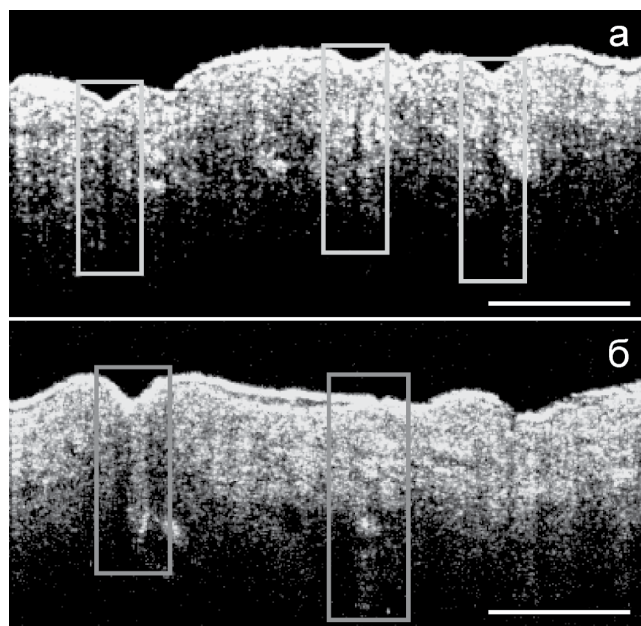


Рис. 3. А-сканы контрольного участка кожи (а) и участка с внедрением частиц карбоната кальция, нагруженных AMFF (б), полученные *in vivo* с помощью оптической когерентной томографии. Длина масштабного отрезка соответствует 500 мкм, прямоугольниками выделены пустые (а) и обильно заполненные частицами (б) волосные фолликулы

Fig. 3. A-scans of the control area of the skin (a) and the area with introduced calcium carbonate particles loaded with AMFF (b), obtained *in vivo* using optical coherent tomography. The length of the scale segment corresponds to 500 μm ; empty (a) and hair follicles copiously filled with the particles (b) are highlighted with rectangles

ликулы *in vivo* в область предплечья здорового добровольца.

Оценка эффективности интрафолликулярного внедрения частиц, нагруженных фотосенсибилизатором, проводилась путем *in vivo* ОКТ визуализации волося-

ных фолликулов участка кожи до (рис. 3а) и после нанесения их суспензии (рис. 3б).

Незаполненные волосные фолликулы контрольного участка (темные каналы, выделенные прямоугольниками, на рис. 3а) четко различимы на продольных виртуальных ОКТ-сканах кожи. Изображение после внедрения контейнеров демонстрирует обильное заполнение фолликулов на всю визуализируемую глубину (заполненные фолликулы выделены прямоугольниками на рис. 3б).

Успешность заполнения волосных фолликулов предположительно обусловлена тем, что физические свойства (шероховатость поверхности, плотность, масса и размер) пористых частиц карбоната кальция удовлетворяют условиям проникновения вдоль волоса. Механизм продвижения частиц вглубь волосного фолликула ранее был описан на основе предположения, что при механическом воздействии на поверхность кожи (массаж, ультразвук и т. д.) стержень волоса с чешуйками кератиноцитов, формирующих его зигзагообразный рельеф, колеблется и тем самым выполняет роль внедряющей «помпы», проталкивая частицы, нанесенные на поверхность кожи, все глубже внутрь фолликула [5]. Определяющую роль в глубоком проникновении частиц при таком подходе играет размер внедряемых частиц, который должен быть сопоставим с размером кератиноцитов, составляющим 500–800 нм.

Для оценки эффективности интрафолликулярного внедрения AMFF с помощью матриц-носителей осуществлялось исследование флуоресцентного сигнала изъятых из фолликулов волос до (рис. 4а–в) и после внедрения нагруженных препаратом контейнеров (рис. 4г–е) при помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Наличие яркого флуоресцентного сигнала, регистрируемого от россыпи частиц после разрушения

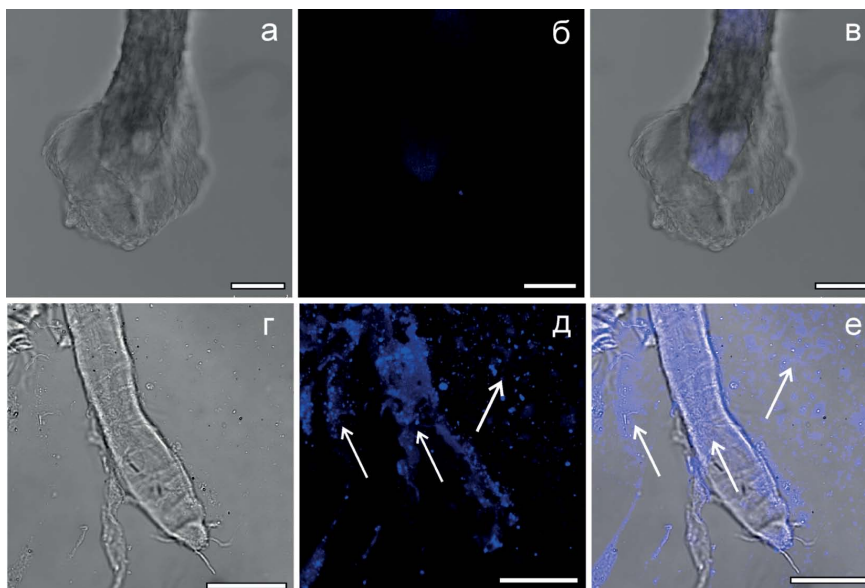


Рис. 4. Флуоресцентные изображения волоса, изъятых из фолликула, до (а–в) и после внедрения нагруженных AMFF частиц (г–е), полученные методом сканирующей лазерной конфокальной микроскопии: а, г — светлопольные изображения; б, д — флуоресцентные изображения; в, е — наложение светлопольного и флуоресцентного каналов. Стрелки указывают на скопления контейнеров. Масштабный отрезок на верхних изображениях (а–в) соответствует 50 мкм, на нижних (г–е) — 20 мкм

Fig. 4. Fluorescent images of a hair removed from the follicle before (a–v) and after the introduction of AMFF loaded particles (r–e) obtained by scanning laser confocal microscopy: a, r — bright field images; б, д — fluorescent images; в, е — overlapping of the bright-field and fluorescent channels. Arrows indicate clusters of containers. The scale section in the upper images (a–v) and lower (r–e) images corresponds to 50 μm and 20 μm , respectively

волосяного «мешочка» (рис. 4д–е), указывает на успешность переноса фотосенсибилизатора по волосьям фолликулам при помощи CaCO_3 -частиц. Отсутствие выраженной флуоресценции при заданных параметрах съемки до внедрения частиц (рис. 4б–в) подтвердило, что указанный сигнал относится к внедренным в фолликул контейнерам.

В связи с успешностью внедрения нагруженных фотосенсибилизатором частиц целесообразным явилось проведение пилотного эксперимента по формированию пигментированных участков кожи *in vivo* под действием УФА ($\lambda = 320\text{--}400\text{ нм}$).

Согласно модели эксперимента, измерение и фотофиксация исследуемых участков проводились до нанесения веществ, а также через 30 минут, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 360 часов и через 75 дней (2,5 месяца). Макрофотографии представлены на рис. 5 и 6, результаты дерматоскопического исследования приведены на рис. 7.

При визуальном осмотре двумя независимыми наблюдателями получены следующие результаты. *До нанесения:* в зонах 1, 2 и 3 дополнительных очагов пигментации не наблюдалось. *Через 30 минут* (рис. 5) после нанесения суспензий и облучения УФА в зоне 1 (внедрение ненагруженных частиц CaCO_3) и зоне 2 (внедрение частиц CaCO_3 , нагруженных AMFF) видимых изменений не наблюдалось, в то время как в зоне 3 (внедрение свободного раствора AMFF) было зарегистрировано пятно светло-коричневого цвета без четких границ и склонности к распространению. Зона 1 в дальнейшем в течение всего эксперимента (2,5 месяца) сохраняла свое состояние без клинически значимых изменений. *В течение 48 часов* (рис. 5) в зоне 2 формировался очаг легкой гиперпигментации светло-коричневого цвета без четких границ и склонности к росту и слиянию, пятно в зоне 3 приобретало более интенсивный цвет, округлую форму и четкие границы. Далее в зонах 2 и 3 наблюдалось постепенное прогрессирование изменений клинической

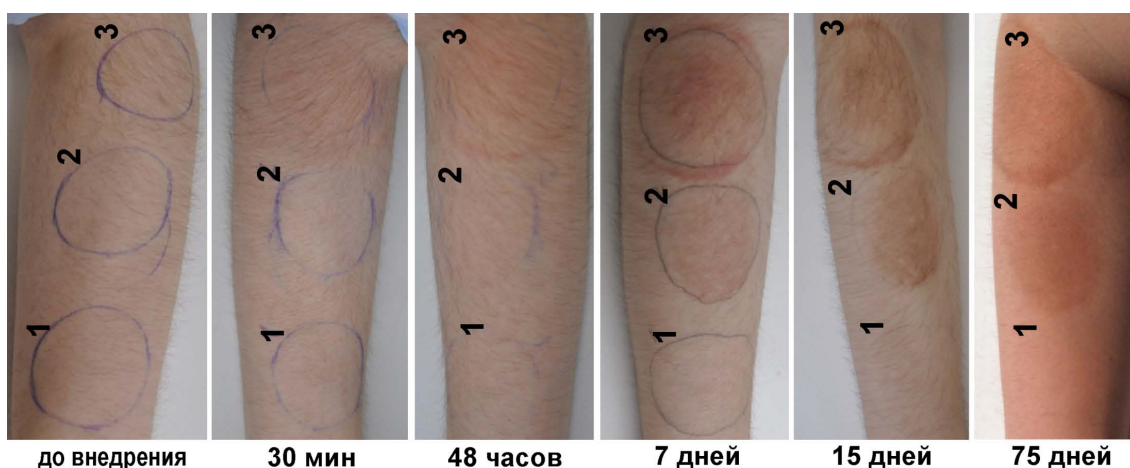


Рис. 5. Макрофотографии 1–3 зон предплечья добровольца до и после нанесения исследуемых композиций, сопровождаемого облучением длинноволновым ультрафиолетом в течение 2,5 минуты: зона 1 — внедрение ненагруженных частиц карбоната кальция; зона 2 — частиц карбоната кальция, нагруженных AMFF; зона 3 — свободного раствора AMFF

Fig. 5. Macro photographs of 1–3 zones of the volunteer's forearm before and after the application of the studied compositions, followed by irradiation with long-wave ultraviolet for 2.5 minutes: zone 1 — introduction of unloaded calcium carbonate particles; zone 2 — introduction of calcium carbonate particles loaded with AMFF; zone 3 — introduction of free AMFF solution

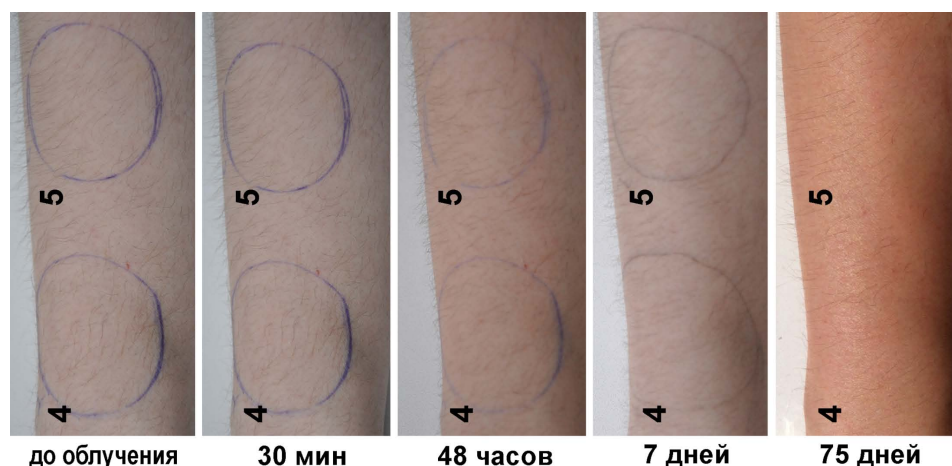


Рис. 6. Макрофотографии контрольных зон предплечья добровольца до и после облучения длинноволновым ультрафиолетом в течение 2,5 минуты: зона 4 — ультразвуковое воздействие на зону без аппликации препарата; зона 5 — без аппликации и ультразвукового воздействия

Fig. 6. Macro photographs of the control zones of the volunteer's forearm before and after irradiation with long-wave ultraviolet for 2.5 minutes: zone 4 — ultrasound impact on the zone without the application of the compositions; zone 5 — without compositions and ultrasound exposure

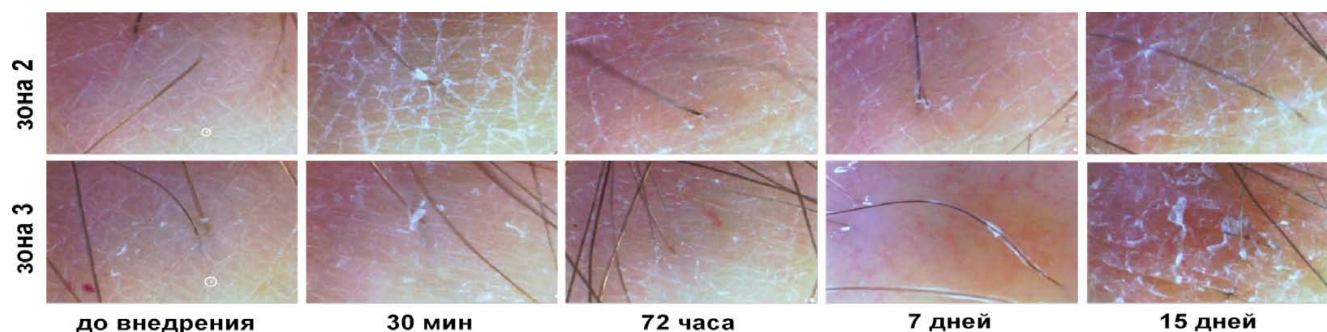


Рис. 7. Микрофотографии 2 и 3 зон предплечья добровольца до и после нанесения исследуемых композиций, сопровождаемого облучением длинноволновым ультрафиолетом в течение 2,5 минуты: зона 2 (верхняя линия) — внедрение частиц карбоната кальция, нагруженных AMFF; зона 3 (нижняя линия) — аппликация свободного раствора AMFF

Fig. 7. Micrographs of 2 and 3 zones of the volunteer's forearm before and after the application of the studied compositions, followed by irradiation with long-wave ultraviolet for 2.5 minutes: zone 2 (upper line) — introduction of calcium carbonate particles loaded with AMFF; zone 3 (bottom line) — application of free AMFF solution

картины с заметным усилением интенсивности пигментации: *через 96 часов* очаг в зоне 3 приобрел красно-коричневую окраску, *через 168 часов (7 дней)* очаг в зоне 2 также приобрел красно-коричневую окраску (рис. 5). Далее в зонах 2 и 3 продолжалось прогрессирование изменений, *через 360 часов (15 дней)* результирующее в формирование очагов гиперпигментации ярко-коричневого цвета овальной формы с четкими границами (рис. 5). *Через 75 дней (2,5 месяца)* очаги имели выраженный коричневый оттенок, было отмечено разрастание и выравнивание пигментации по всей области внедрения фотосенсибилизатора в зонах 2 и 3, особенно однородной являлась пигментация в области 2, соответствующей внедрению иммобилизованного в CaCO_3 -частицы препарата AMFF.

В зоне 4 наблюдались незначительно выраженные очаги пигментации, являющиеся результатом воздействия длинноволнового ультрафиолетового излучения в течение 2,5 минуты. В зоне 5 на протяжении всего периода проведения исследования клинически значимых изменений в структуре кожного покрова не отмечалось (рис. 6).

При анализе данных, полученных в результате дерматоскопического исследования (рис. 7), ведущим диагностическим признаком выступал характер распределения пигмента в исследуемых участках. *До нанесения* в зонах 2 и 3 дополнительных очагов пигментации не наблюдалось. *Через 30 минут* в обеих зонах появились отдельные скопления пигмента. *В течение 72 часов* в зонах 2 и 3 отмечалось незначительное скопление пигмента. По прошествии *96 часов* (рис. 7) в зоне 2 проявились признаки перифолликулярной концентрации пигмента желтовато-коричневого цвета, в зоне 3 было отмечено прогрессирование и интенсификация пигментации. В дальнейшем в зонах 2 и 3 наблюдалось формирование пигментации желтовато-коричневого цвета, а также появление сосудистого компонента и чешуек белесоватой окраски, выступающих в качестве ответа на воздействие ультрафиолетового излучения. *Через 168 часов (7 дней)* в зонах 2 и 3 наблюдалось усиление изменений дерматоскопической картины в виде скопления пигмента ярко-коричневого цвета, причем в зоне 2 отмечалась тенденция к его перифолликулярной локализации. *Через 360 часов (15 дней)* зона 2 была охарактеризована диффузным распределением пигмента с преимущественной концентрацией вокруг

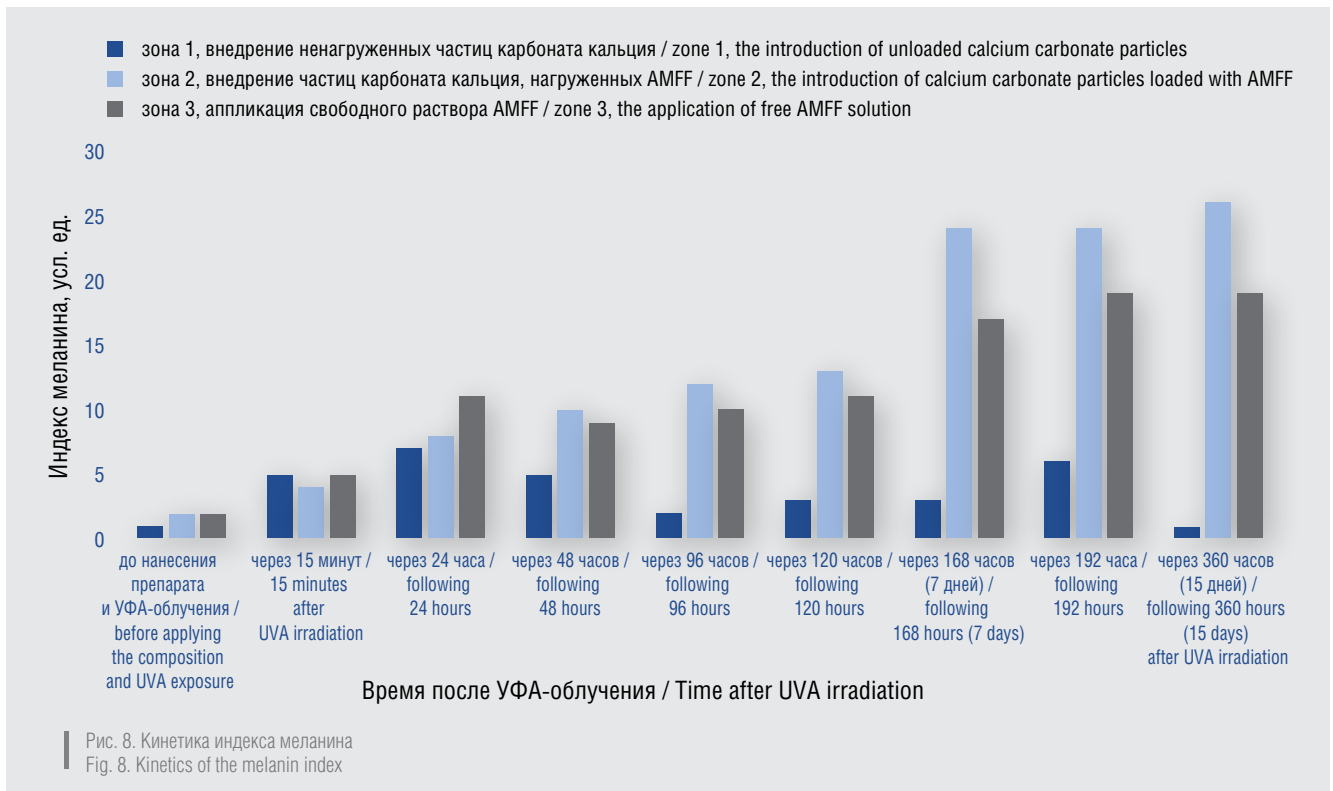
волосяных фолликулов, наличием чешуек белесоватой окраски и присутствием сосудистого компонента, в то время как в зоне 3 наблюдалось равномерное распределение пигмента ярко-коричневого цвета, также сопряженное с наличием большого количества чешуек белесоватого цвета и капилляров.

Дерматоскопическое исследование также не выявило клинически значимых изменений в зонах 1, 4 и 5.

Таким образом, анализ микрофотографий подтвердил и уточнил выводы, сделанные в результате визуального осмотра кожных покровов предплечья добровольцев. Особого внимания заслуживает перифолликулярный характер пигментации, формируемой в течение 15 дней после УФА-облучения зон с внедрением AMFF, иммобилизованного в CaCO_3 -частицы, подтверждающий факт успешной доставки фотосенсибилизатора в пространство волосяных фолликулов.

На рис. 8 представлены результаты измерения индекса пигментации от времени после УФА-облучения в зоне 1 (внедрение ненагруженных частиц CaCO_3), зоне 2 (внедрение частиц CaCO_3 , нагруженных фотосенсибилизатором) и зоне 3 (аппликация раствора AMFF).

На рис. 8 отчетливо различимы две волны пигментации после УФА-облучения. Первая — так называемое мгновенное пигментное потемнение — объясняется фотоокислением уже присутствующих в тканях предшественников меланина. Этот процесс начинается сразу же после воздействия УФА-излучения и длится до 72 часов. Далее на первый план выходит пигментация, называемая замедленным пигментным потемнением и являющаяся следствием расширения пула меланоцитов и активацией продукции меланина — «вторая волна пигментации» [20, 21]. Таким образом, при адресной доставке фотосенсибилизатора в объем волосяных фолликулов с помощью частиц карбоната кальция (зона 2) минимизируется фотосенсибилизатор-стимулированная мобилизация присутствующих в эпидермисе предшественников меланина, что обуславливает более умеренный характер пигментации этой зоны в течение первых 96 часов по сравнению с зоной, где осуществлялась аппликация свободной формы препарата (зона 3). Через 168 часов большой вклад в формирование очага пигментации вносит «вторая волна», вызванная активацией продукции меланина, и в связи с этим интенсифицируется пигментация зоны 2.



Еще в 60-х годах прошлого столетия было показано, что при В последними участки депигментации покидают меланоциты, локализирующиеся в волосяных фолликулах [22]. Именно эти меланоциты являются привлекательной мишенью для воздействия лекарственных препаратов и ультрафиолетовых лучей. Таким образом, при адресном введении (зона 2 с внедрением нагруженных AMFF) осуществляется доставка фотосенсибилизатора в участки максимальной концентрации меланоцитов. В связи с этим предложенный способ адресной доставки AMFF позволяет оптимизировать методику фотохимиотерапевтического воздействия и открывает многообещающие перспективы в терапии В.

Заключение

В результате проведенной работы достоверно установлено, что частицы карбоната кальция, выступающие в роли контейнера-носителя, способны осуществить адресную доставку фотосенсибилизатора AMFF в пространство волосяных фолликулов, что обеспечивает высокую избирательность и терапевтическую точность, способствуя повышению эффективности проводимой терапии и комплаентности для пациента. Планируются дальнейшие исследования по оптимизации методики адресной доставки лекарственных средств в очаг поражения и фотохимиотерапевтического воздействия. ■

Литература/References

1. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс, 2016. [Federal clinical guidelines. Dermatovenereology 2015: Diseases of the skin. Sexually Transmitted Infections. 5th ed., revised and enlarged. Moscow: Business express, 2016. (In Russ.)]
2. Afsheen B., Irfan A. Guidelines for the management of vitiligo. Journal of Pakistan Association of Dermatologists. 2014;24(1):68–78.
3. Amanjot K. A., Sunil D. Narrowband ultraviolet B and beyond: Evolving role of phototherapy in vitiligo. Pigment International. 2015;2(1):9–20.
4. Bellet J. S., Prose N. S. Vitiligo in children: a review of classification, hypotheses of pathogenesis and treatment. An Bras Dermatol. 2005;80(6):633–636.
5. Lademann J., Knorr F., Richter H., Jung S. et al. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2015;8(4):1530004 1–8.
6. Knorr F., Lademann J., Patzelt A. et al. Follicular transport route—research progress and future perspectives. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009;71(2):173–180.
7. Wosicka H., Cal K. Targeting to the hair follicles: current status and potential. Journal of dermatological science. 2010;57(2):83–89.
8. Cui J., Shen L. Y., Wang, G. C. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. Journal of Invest Dermatol. 1991;97(3):410–416.
9. Ortonne J. P., Schmitt D., Thivolet J. PUVA-induced repigmentation of vitiligo: scanning electron microscopy of hair follicles. Journal of Invest Dermatol. 1980;74(1):40–42.

10. Meidan V. M., Bonner M. C., Michniak B. B. Transfollicular drug delivery — is it a reality? *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;306:1–14.
11. Toll R., Jacobi U., Richter H. et al. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004;123(1):168–176.
12. Fang C. L., Aljuffali I. A., Li Y. C. et al. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Therapeutic delivery*. 2014;5(9):991–1006.
13. Parakhonskiy B. V., Haase A., Antolini R. Sub Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012;51(5):1195–1197.
14. Svenskaya Y., Parakhonskiy B., Haase A. et al. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophysical chemistry*. 2013;182:11–15.
15. Фицпатрик Т., Джонсон Р., Полано М. и др. Дерматология: Атлас-справочник. Мак-Гроу-Хилл: Практика, 1999. [Fitzpatrick T., Dzhonson R., Polano M. et al. *Dermatology: Atlas Handbook*. McGraw Hill: Practice, 1999. (In Russ.)].
16. Volodkin D. V., Petrov A. I., Prevot M. et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation. *Langmuir*. 2004;20(8):3398–3406.
17. Svenskaya Y. I., Pavlov A. M., Gorin D. A. et al. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;146:171–179.
18. Parakhonskiy B. V., Foss C., Carletti E. et al. Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles. *Biomaterials Science*. 2013;1(12):1273–1281.
19. Fujiwara M., Shiokawa K., Morigaki K. et al. Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules. *Chemical Engineering Journal*. 2008;137(1):14–22.
20. Skotarczak K., Osmola-Mankowska A., Lodyga M. et al. Photoprotection: facts and controversies. *European Review for Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2015;19:98–112.
21. Fajuyigbe D., Young A. R. The impact of skin colour on human photobiological responses. *Pigment Cell Melanoma*. 2016;29(6):607–618.
22. Pathak M. A., Riley F. C., Fitzpatrick T. B. Melanogenesis in human skin following exposure to long-wave ultraviolet and visible light. *Journal of Invest Dermatol*. 1962:435–443.

Информация об авторах

Сергей Рудольфович Утц — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой кожных и венерических болезней Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации

Глеб Борисович Сухоруков — к.ф.-м.н., профессор, заведующий кафедрой биомедицинских материалов Школы материаловедения и инженерии Лондонского университета Королевы Марии

Валерий Викторович Тучин — д.ф.-м.н., профессор, заведующий кафедрой оптики и биофотоники, директор Научно-образовательного института оптики и биофотоники Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского; научный руководитель лаборатории биофотоники Национального исследовательского Томского государственного университета

Дмитрий Александрович Горин — д.х.н., доцент, заместитель директора Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, профессор кафедры физики полупроводников Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского

Элина Алексеевна Генина — к.ф.-м.н., доцент кафедры оптики и биофотоники, старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской оптики Научно-образовательного института оптики и биофотоники Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник междисциплинарной лаборатории биофотоники Национального исследовательского Томского государственного университета

Юлия Игоревна Свенская* — к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского; e-mail: yulia_svenskaya@mail.ru

Екатерина Евгеньевна Тальникова — ординатор кафедры кожных и венерических болезней Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации

Information about the authors

Sergey R. Utz — Dr. Sci. (Med.), Prof., Departmental Head, Department of Skin and Venereal Diseases, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation; e-mail: s_utz@mail.ru

Gleb B. Sukhorukov — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Prof., Chair of Biomedical Materials Division, School of Engineering and Materials Science, Queen Mary University of London

Valery V. Tuchin — Dr. Sci. (Phys.-Math.), Prof., Departmental Head, Department of Optics and Biophotonics, Director of Research and Educational Institute of Optics and Biophotonics, Saratov State University; Research Supervisor, Laboratory of Biophotonics, National Research Tomsk State University

Dmitry A. Gorin — Dr. Sci. (Chem.) Associate Professor, Deputy Director of Research and Educational Institute of Optics and Biophotonics; Prof., Department of Semiconductor Physics, Saratov State University

Elina A. Genina — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Associate Professor, Department of Optics and Biophotonics, Senior Researcher, Laboratory of Biomedical Optics, Research and Educational Institute of Optics and Biophotonics, Saratov State University; Leading Researcher, Laboratory of Biophotonics, National Research Tomsk State University

Yuliya I. Svenskaya* — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Researcher, Laboratory of Remote Controlled Theranostic Systems, Saratov State University; e-mail: yulia_svenskaya@mail.ru

Ekaterina E. Talnikova — Registrar, Department of Skin and Venereal Diseases, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation