20

Иммерсионное просветление кожи с помощью водного раствора мочевины: данные оптической когерентной томографии и молекулярное моделирование

© К.В. Березин[1], Е.Ю. Степанович[2], А.М. Лихтер[2], К.Н. Дворецкий[3], Е.В. Грабарчук[2], И.Ю. Янина[1,4], В.В. Тучин[1,4,5]

[1] Саратовский национальный исследовательский государственный университет,
Саратов, Россия
[2] Астраханский государственный университет,
Астрахань, Россия
[3] Саратовский государственный медицинский университет,
Саратов, Россия
[4] Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Россия
[5] Институт проблем точной механики и управления, ФИЦ „Саратовский научный центр РАН“,
Саратов, Россия

e-mail: berezinkv@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.06.2025 г.
В окончательной редакции 08.08.2025 г.
Принята к публикации 25.11.2025 г.

С помощью метода оптической когерентной томографии получены результаты иммерсионного оптического просветления кожи человека *in vivo* с использованием в качестве иммерсионного агента 50%-водный раствор мочевины. Для оценки эффективности оптического просветления определялись значения скорости изменения коэффициента рассеяния света, полученные с помощью усредненного A-скана оптической когерентной томографии сигнала на участке дермы на глубине от 350 до 700 μm. В результате молекулярного моделирования методами полноатомной молекулярной динамики (GROMACS) определено влияние 50%-водного раствора мочевины на пространственный объем фрагмента микрофибриллы коллагена $5((\mathrm{GPH})_{12})_3$. Методами квантовой химии HF/STO3G/DFT/B3LYP/6-311G(d) рассчитана энергия межмолекулярного взаимодействия в комплексе мочевины с фрагментом пептида коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_2$, уточнены параметры регрессионного уравнения, связывающего эффективность оптического просветления с энергией межмолекулярного взаимодействия. Обсуждена термодинамика водородных связей, формирующихся при взаимодействии мочевины с пептидом коллагена и молекулами воды.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, оптическое просветление кожи человека, термодинамика водородной связи, молекулярная динамика, квантовая химия, мочевина.

DOI: 10.21883/0000000000

Введение

Применение современных технологий фотомедицины и биомедицинской оптики в диагностике и лечении заболеваний сталкивается с ограничениями, связанными с выраженным светорассеянием в коже и большинстве биологических тканей в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах. Основной причиной рассеяния является наличие случайно ориентированных неоднородностей показателя преломления, возникающих на границах макромолекулярных структур, прежде всего коллагеновых волокон, которые играют ключевую роль в формировании оптических свойств кожи [1].

Эти ограничения, в частности, преодолеваются путем введения в ткань биосовместимых молекулярных агентов, которые в той или иной степени способствуют ее оптическому просветлению (ОП) [1–9]. Экспериментальным *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* реализациям метода ОП на различных типах биотканей посвящено довольно много обобщающих работ — аналитических обзоров и монографий [10–14], что говорит об актуальности проблемы. В исследовании [15] авторы использовали оптическую когерентную томографию (ОКТ) для визуализации и количественной оценки процесса доставки вакцин через кожу. Они продемонстрировали как ОКТ можно использовать для наблюдения за проникновением микрочастиц вакцины в кожу в режиме реального времени. Работа [16] посвящена методу увеличения глубины визуализации с помощью ОКТ. Исследователи использовали технику ОП поверхностного слоя кожи, чтобы уменьшить рассеяние света и тем самым улучшить качество и глубину получаемых изображений. Это позволило им более детально изучать структуры, расположенные глубже под поверхностью кожи. Обе работы демонстрируют как ОКТ может быть эффективным инструментом для исследования процессов в коже, в частности, для

изучения проникновения веществ и улучшения качества визуализации.

Во многих работах описаны интересные применения метода или доказывается его универсальность и многомодальность. Так, например, в работе [17] описано применение метода в криминалистике для посмертной визуализации перинатальной твердой мозговой оболочки и верхнего сагиттального синуса с использованием ОКТ. В работе [18] методами ОКТ оценено синергетическое действие иммерсионного агента (ПЭГ-400), двух химических усилителей проницаемости биоткани (триазина и 1,2-пропандиола) и механического массажа на эффективность ОП кожи крысы *in vivo*. Мочевину часто используют в качестве одного из компонентов в смеси различных оптических просветляющих агентов (ОПА) [11,19–21]. В работе [22] предложена математическая модель для решения обратной задачи переноса излучения в биотканях с целью определения коэффициентов рассеяния и поглощения при ОП с учетом осмотической активности ОПА. Два подхода для неинвазивного исследования локальной диффузии иммерсионных ОПА с использованием ОКТ описаны в [23]. В работе [24] рассмотрено влияние модельного сахарного диабета на ОП кожи лабораторных мышей и показана существенная затрудненность диффузии ОПА в гликированных тканях. В работе [25] путем визуализации с помощью автофлуоресценции при двухфотонном возбуждении и второй оптической гармоники (SHG-imaging) исследовался механизм ОП кожи при использовании глицерина и рентгеноконтрастного препарата Омнипак® (йогексол) в качестве ОПА. Выяснению механизмов ОП коллагеновой ткани в норме и при гликировании с помощью многофотонной томографии посвящена работа [26]. В работе [27] представлены результаты исследований дегидратирующих свойств ОПА и отмечается, что дегидратация — это только один из возможных механизмов, приводящих к ОП биотканей. Иным механизмом снижения сечения рассеяния коллагеновых волокон может быть их обратимая диссоциация, которая тоже связана непосредственно с молекулярным взаимодействием ОПА и коллагена [28]. Недавно был предложен новый подход [29] к достижению оптической прозрачности в биологических тканях, который использует сильно поглощающие свет вещества для изменения показателя преломления водной среды. Это приводит к значительному снижению светорассеяния. Исследование показало, что пищевые водорастворимые красители, такие как тартразин, могут делать ткани прозрачными в красной и ближней инфракрасной областях спектра. Этот метод основывается на повышении действительной части показателя преломления водной биологической среды (плазмы крови, межтканевой жидкости или цитоплазмы) за счет явления аномальной дисперсии и был предложен и детально исследован в работах [30–34], где в качестве поглощающего вещества использовался гемоглобин.

Проведение исследований в области взаимодействия ОПА с биотканями открывает путь к пониманию физических и биофизических процессов, лежащих в основе ОП на молекулярном уровне [3,6,28,35–39]. Это, в свою очередь, позволит находить новые эффективные ОПА с заданными свойствами, оптимальными для конкретного типа биоткани.

Настоящая работа является продолжением изучения авторами молекулярных механизмов на постдиффузионной стадии ОП биотканей [6,28,35–39] на примере действия водного раствора мочевины. Начиная с работы [38], протокол молекулярного моделирования на основе полуэмпирического метода PM6 был заменен на неэмпирический метод Хартри-Фока (HF) [40], поскольку в результате предварительного исследования было установлено, что полуэмпирический метод дает некорректные результаты для молекул со сложной электронной структурой, таких как йогексол.

Методика и результаты эксперимента

Оптическое просветление кожи *in vivo* проводили с использованием 50 %-водного раствора мочевины. Раствор мочевины готовили методом точного взвешивания: на микроаналитических весах (DA-225DC с калибровкой (0.001 g), BelEngineering, Италия). Взвешивали компоненты раствора, которые потом переносили в мерную колбу для растворения и тщательно перемешивались с помощью вихревой мешалки.

Показатели преломления измерялись с помощью многоволнового рефрактометра Аббе Atago DR-M2 1550 (Atago, Япония) на длинах волн 589 и 930 nm при температуре 25.0 °C. Значения показателей преломления, молекулярных массы и осмоляльности раствора мочевины приведены в табл. 1.

Для оценки оптических просветляющих свойств раствора мочевины использовался метод ОКТ. В работе использовался спектральный томограф GAN930V2-BU (Thorlabs, США) с центральной длиной волны излучения 930 ± 5 nm; значения продольного разрешения на воздухе составляет 6.2 μm, а поперечного 9.6 μm; размеры области поперечного сканирования — 2 mm.

Исследования проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и были одобрены Этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского (№ 11 от 7 августа 2022 г.). Измерения проводились на тыльной стороне предплечья. Предварительно роговой слой на этом участке кожи удалялся с помощью медицинского скотча, который накладывался квадратами 2×2 cm к размеченной области большим пальцем руки с силой 6H в течение 5 s. Всего делались три аппликации. Двумерные сканы (B-сканы) исследуемой области записывались в течение 60 min с интервалом в 3 min. В измерениях принимали участие пять добровольцев в возрасте от 25

Таблица 1. Физические свойства раствора мочевины

Иммерсионный агент	Химическая формула	Молекулярная масса (g/mol)	Показатель преломления для $\lambda = 589$ nm	Показатель преломления для $\lambda = 930$ nm	Осмоляльность (Osm/kg H_2O)
Мочевина 50 % водный раствор	CH_4N_2O	60.06	1.407	1.3981	16.67*

Примечание. * Рассчитанное значение.

до 57 лет обоих полов. Всего было проведено пять измерений для водного раствора мочевины.

Зарегистрированный ОКТ-сигнал, согласно модели однократного рассеяния [24,41–44], описывается выражением

$$R(z) \sim \exp(-\mu_t z), \tag{1}$$

где коэффициент ослабления

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a, \tag{2}$$

z — глубина сканирования.

Так как коэффициент поглощения μ_a кожи значительно меньше коэффициента рассеяния μ_s в диапазоне 930–100 nm [1], то коэффициентом поглощения μ_a можно пренебречь, а значит $R(z)$ можно аппроксимировать следующим выражением [46]:

$$R(z) = A\exp(-\mu_s z) + B, \tag{3}$$

где A — коэффициент пропорциональности, равный $P_0 a(z)$, P_0 — мощность оптического излучения, падающего на поверхность кожи, $a(z)$ — локальный коэффициент обратного отражения, который характеризует способность кожи рассеивать свет назад и определяется локальным скачком (флуктуацией) показателя преломления, B — фоновый сигнал. Подбор коэффициентов в приведенном выражении для аппроксимации экспериментальной кривой позволяет оценить усредненный по выбранному отрезку глубины продольного сканирования z коэффициент рассеяния объекта исследований. Модель однократного рассеяния, часто используемая в исследованиях, является эффективным инструментом при определенных условиях, но ее применение требует осознания ограничений, связанных, например, с пренебрежением диффузным распространением фотонов и неоднородностью среды, которой является кожа. При анализе более глубоких слоев кожи или при необходимости очень точной количественной оценки может потребоваться использование более сложных моделей, учитывающих многократное рассеяние.

На рис. 1 представлены ОКТ-изображения (B-скан) кожи сразу после нанесения на него водного раствора мочевины и усредненный A-скан ОКТ-сигнала дермального слоя кожи человека, а также аппроксимирующая кривая, построенная на основе модели однократного рассеяния (3). Сигналы ОКТ в виде A-сканов усреднялись по всей ширине скана 2 mm вдоль поверхности кожи. Значения коэффициента рассеяния определялись в области усредненного A-скана на глубине от 350 до 700 μm.

Визуально из рис. 1, *a* видно, что с течением времени изображение верхних слоев кожи становится более темным, а более глубоких — немного более светлым, что говорит о том, что под действием раствора мочевины рассеяние света верхними слоями кожи уменьшается и свет проходит в нижние слои, где более интенсивно отражается от неоднородностей, что несет информацию о глубоколежащих объектах внутри ткани. Количественно это хорошо отражается на рис. 1, *b*.

Численные значения коэффициента рассеяния, полученные с помощью усредненного A-скана в области дермы на глубинах от 350 до 700 μm, использовались для оценки эффективности оптического просветления (ЭОП) кожи *in vivo*. Зависимость коэффициентов рассеяния под действием раствора мочевины от времени наблюдения представлена на рис. 2. Видно, что для раствора мочевины значение коэффициента рассеяния μ_s на большом интервале времен воздействия хорошо описывается моделью линейной регрессии (коэффициент корреляции R^2 составляет 97 %).

Для численной оценки ЭОП кожи человека использовались значения модуля средней скорости снижения коэффициента рассеяния. Это значение представляет собой коэффициент наклона, определенное из уравнений линии регрессии и численно равное $1.02\,\mathrm{cm}^{-1}\mathrm{min}^{-1}$.

Молекулярное моделирование

Выбранные нами для проведения моделирования структуры пептида-миметика коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_9$ [46] и ее сокращенный вариант $((\mathrm{GPH})_3)_2$ (рис. 3) представляют собой наибольшую часть регулярных доменов человеческого коллагена. Их пространственная структура была построена по данным Protein Data Bank (PDB). Также в модели были добавлены атомы водорода с последующей оптимизацией их геометрической структуры методом молекулярной механики [47]. Данная модель имеет ограничения связанные с тем, что в ней отсутствуют другие виды триплетов, например Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Lys, которые тоже присутствуют в нативном коллагене. Кроме этого, модель ограничена по длине спирали, что оказывает влияние на стабильность и жесткость, характерные для нативного коллагена. Структура,

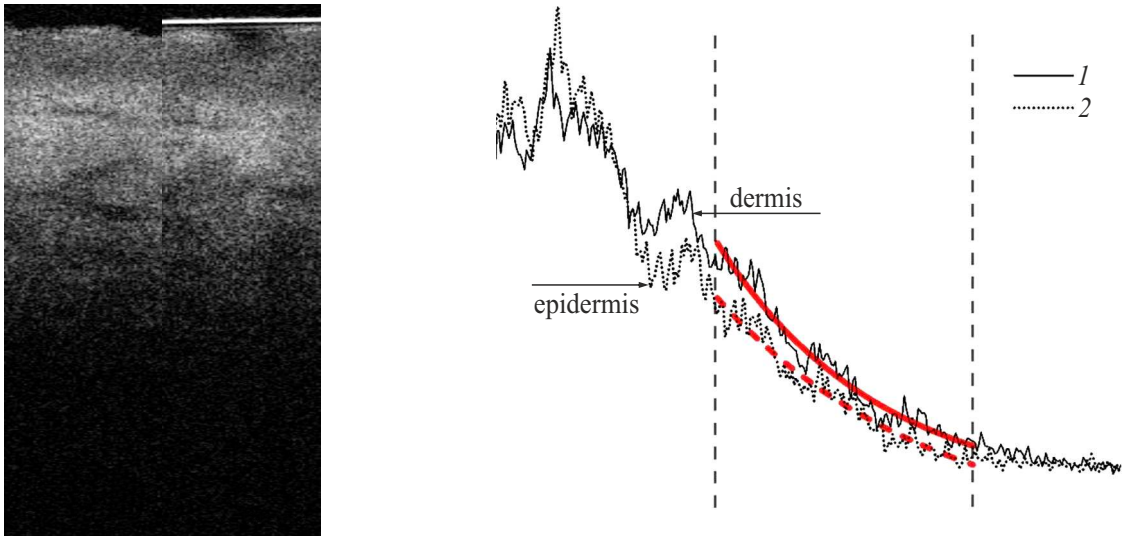

Рис. 1. Измерения коэффициента рассеяния μ_s на участке дермы после нанесения на поверхность раствора мочевины на основе анализа распределения ОКТ-сигнала, усредненного по глубине с помощью модели однократного рассеяния: *a* — изображения B-скана кожи *in vivo*, по фрагменту которого проводилось усреднение ОКТ-сигнала сразу после нанесения и после 55 min воздействия; *b* — распределение усредненных ОКТ-сигналов по глубине (тонкая кривая) и результат аппроксимации согласно модели однократного рассеяния (толстые кривые): *1* — сразу после нанесения 50 %-водного раствора мочевины, *2* — через 55 min действия мочевины, штриховыми вертикальными прямыми обозначены границы участков (от 350 до 700 μm), на которых оценивалось значение μ_s, стрелками обозначены слои кожного покрова: эпидермис и дерма.

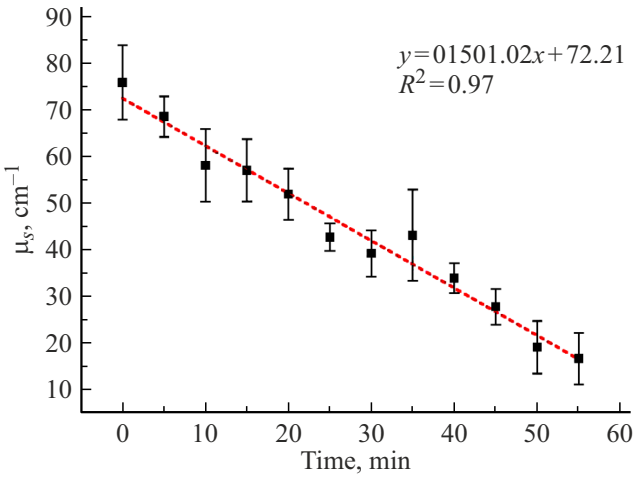

Рис. 2. Временные зависимости коэффициента рассеяния μ_s в дермальном участке (350–700 μm) кожи человека при воздействии на него *in vivo* 50 %-раствором мочевины. Линейная аппроксимация отмечена штриховой линией и выражена в виде уравнения.

представленная на рис. 3, *a*, имеет структурно молекулярный карман размером порядка 10 на 15 ангстрем, который содержит в себе четыре функциональные группы: две гидроксильные (O_1H_1, O_2H_2) и две карбонильные (C_3O_3, C_4O_4), которые образуют водородные связи с молекулами ОПА. Три из них располагаются на одной цепи, а группа O_1H_1 на другой. Протокол молекулярного моделирования состоит из следующих шагов.

Построение и анализ молекулярных структур мочевины

На начальном шаге с помощью метода DFT/B3LYP/6-311+G(d,p) [48,49], реализованного в программе Gaussian [50], был проведен расчет молекулярных моделей молекулы мочевины. Молекула мочевины может иметь два вида конфигурации: первая конфигурация с симметрией C_s (рис. 3, *b*) и вторая с симметрией C_2 (рис. 3, *c*). Наименьшую энергию имеет конфигурация симметрии C_2. Разница в энергиях составляет 3.3 kJ/mol. Для повышения точности и лучшей сходимости при всех расчетах были применены жесткие критерии оптимизации геометрии (opt=tight), самосогласованного поля (SCF=Tight) и интегральной сетки (Int=UltraFine). Вычисленные на этом этапе структурные параметры молекулярной модели мочевины использовались дальше в молекулярной динамике и молекулярном докинге. Следует отметить, что при моделировании рассматривается та часть молекулярного процесса, при котором иммерсионный агент уже начал взаимодействовать непосредственно с коллагеном.

Классическая молекулярная динамика

На этом шаге этапа с помощью пакета классической молекулярной динамики GROMACS [51] с сило-

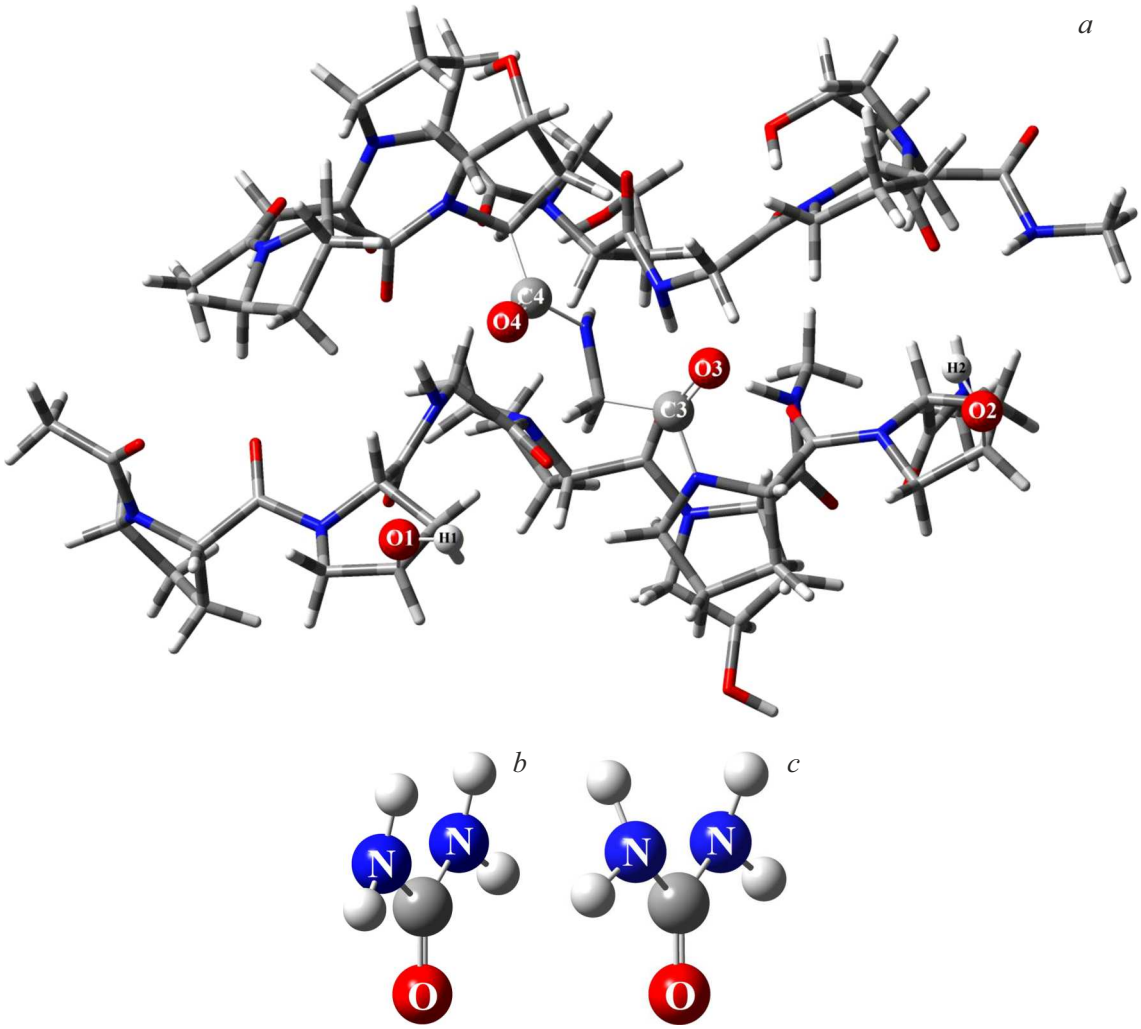

Рис. 3. *a* — структура сокращенного варианта пептида-миметика коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_2$, оптимизированная методом HF/STO-3G (указаны атомы функциональных групп, с которыми образуются водородные связи). Две возможные пространственные структуры молекулы мочевины, рассчитанные методом B3LYP/6-311G+(d,p): *b* — тип симметрии C_s, *c* — тип симметрии C_2 (указаны атомы азота и кислорода).

вым полем AMBER-03 [52] проводилось моделирование межмолекулярного взаимодействия молекул мочевины с пептидами коллагена. Модельная сцена представляла из себя трехмерную ячейку с периодическими границами. Начальные скорости атомов имели максвелловское распределение и задавались с помощью генератора случайных чисел пакета GROMACS. При проведении моделирования использовались термостат и баростат Берендсена [53], обеспечивающие сходимость термодинамических параметров системы к следующим значениям: $T_0 = 307\,\mathrm{K}$, $P_0 = 1\,\mathrm{bar}$. Записанные траектории движения молекул обрабатывались средствами пакета GROMACS и с помощью программы VMD (visual molecular dynamics) [54]. Пример межмолекулярного взаимодействия молекулы мочевины с пептидом коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_9$ приведен на рис. 4, *a*.

Также информативным параметром для установления корреляции между взаимодействием мочевины с белком коллагеном и ЭОП служит изменение объема белка [55]. В рамках молекулярного моделирования была исследована временная зависимость изменения объема пептидов коллагена под действием раствора мочевины и для сравнения двух других часто используемых ОПА, таких как глицерин и йогексол [39]. В качестве структуры пептида-миметика коллагена для моделирования был выбран фрагмент микрофибриллы коллагена $5((\mathrm{GPH})_{12})_3$. Для данного пептида модельная сцена представляла собой ячейку с размерами сторон $5 \times 13 \times 5\,\mathrm{nm}$, в центре которой помещался пептид коллагена. Остальное пространство заполнялось 50 %-водным раствором мочевины (рис. 4, *b, c*). Временной шаг моделирования был выбран равным 0.0001 ps, а полное время моделирования составило 1 ns. Состояние системы записывалось каждую пикосекунду.

На следующем этапе моделирования с помощью молекулярного докинга (программа AutoDockVina [56]) стро-

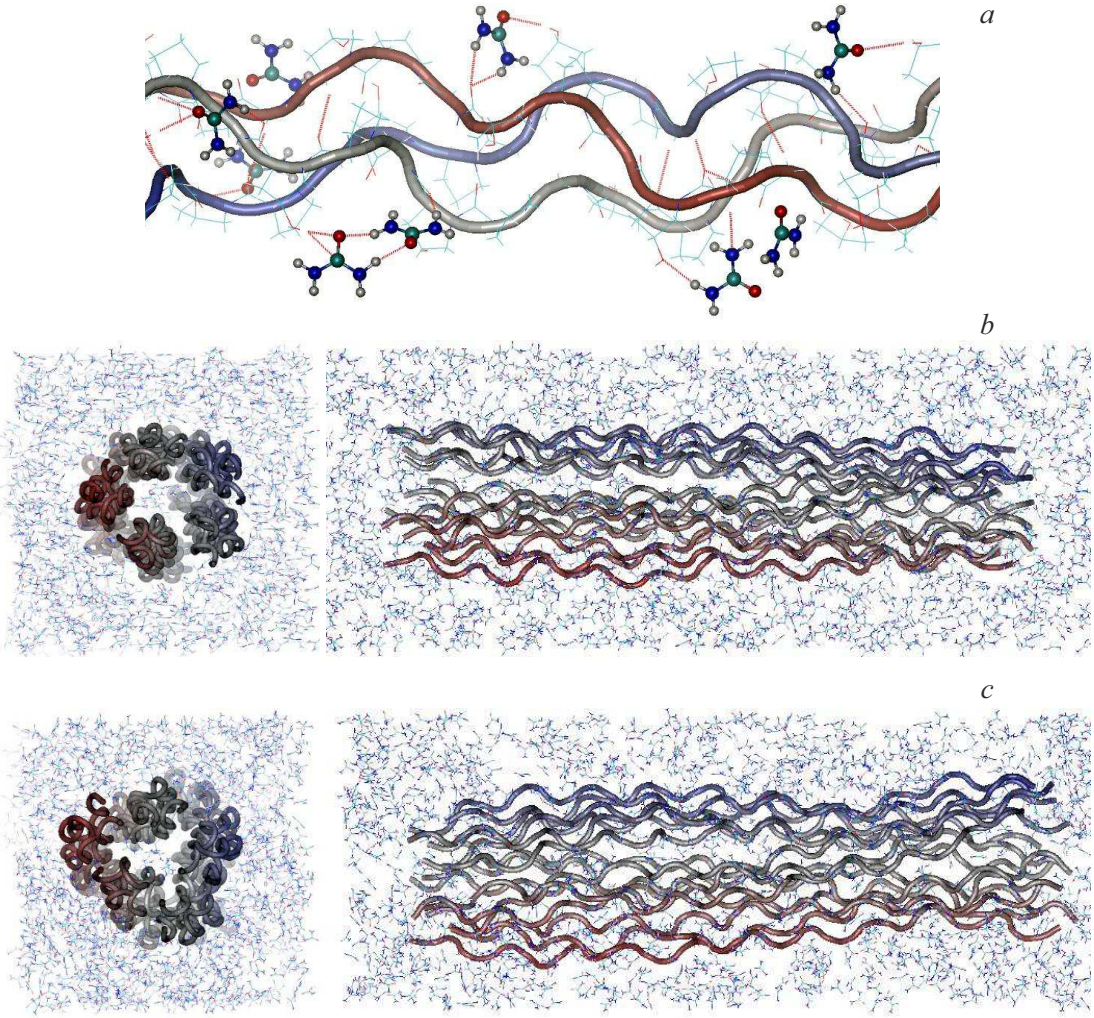

Рис. 4. *a* — фрагменты пространственных структур водородосвязанного комплекса коллагенового пептида $((\mathrm{GPH})_3)_9$ с молекулами мочевины. Пространственное распределение молекул мочевины вокруг пептида коллагена $5(\mathrm{GPH}_{12})_3$, полученное в рамках полноатомной молекулярной динамики в двух различных проекциях: *b* — в начале наблюдения, *c* — через 1 ns.

ились структуры водородосвязанных комплексов модели пептида коллагена и молекулы мочевины. Для мочевины были выбраны десять наиболее энергетически стабильных конфигураций межмолекулярных комплексов.

Методы квантовой химии

На этом этапе проводилась структурная оптимизация всех полученных с помощью молекулярного докинга комплексов $((\mathrm{GPH})_3)_2\ldots$мочевина методом HF/STO3G с последующим уточнением электронной энергии с помощью однократной SCF (self-consistent field) процедуры методом B3LYP/6-311G(d). По аналогичной процедуре рассчитывалась полная электронная энергия пептида коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_2$ и мочевины. Дальше вычислялась энергия ассоциации по формуле

$$\Delta E = E_{\text{комп}} - E_{\mathrm{GPH}} - 2E_{\mathrm{M}}, \qquad (4)$$

где $E_{\text{комп}}$ — полная электронная энергия комплекса $((\mathrm{GPH})_3)_2$-мочевина, E_{GPH} — полная электронная энергия пептида коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_2$, E_{M} — полная электронная энергия молекулы мочевины. На рис. 5 представлен межмолекулярный комплекс $((\mathrm{GPH})_3)_2\ldots(\text{мочевина})_2$ с максимальной энергией ассоциации. Как видно из рис. 5, молекулы мочевины посредством аминогрупп образуют водородную связь между собой, поэтому тем же методом была дополнительно рассчитана энергия образования этой водородной связи, которая оказалась равной 15.7 kJ/mol. Эта энергия была вычтена из энергии ассоциации мочевины с пептидом коллагена.

Для более детального исследования взаимодействия молекулы мочевины с коллагеном и с молекулами воды были проанализированы дополнительно шесть межмолекулярных комплексов, структура которых показана на рис. 6. Все эти исследования проводили с применением функционала wB97XD [57], который специально

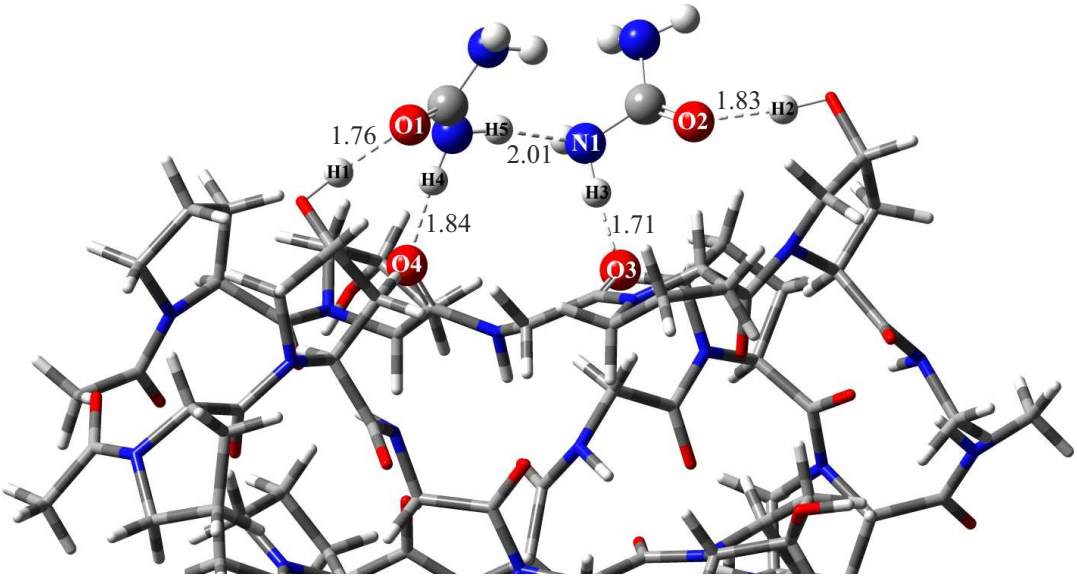

Рис. 5. Фрагмент молекулярной модели комплекса пептида коллагена $((\mathrm{GPH})_3)_2$ с двумя молекулами мочевины, оптимизированный методом HF/STO-3G. Штриховыми линиями на рисунке показаны межмолекулярные водородные связи. Указаны атомы, участвующие в образовании водородных связей, и длины водородных связей (в ангстремах).

разработан для анализа невалентных взаимодействий. При этом использовали расширенный базисный набора 6-311+G(d,p), чтобы исключить ошибку, связанную с ограничением метода HF/STO-3G и соответственно с интерпретацией результатов.

Как видно из рис. 5, находящаяся справа молекула мочевины образует водородные связи только с одной цепью, поэтому была вырезана эта часть цепи и рассмотрели комплекс GPH. . .мочевина, структура которого показана на рис. 6, *a*. Для определения, какую конкуренцию мочевина составляет молекулам воды, сильно связанным с коллагеном, мы рассмотрели комплекс GPH. . .H_2O (рис. 6, *b*). Для анализа, насколько сильно связывает мочевина молекулы воды и влияет соответственно на деструкцию водной структуры, были рассмотрены две разные модели моногидратов (рис. 6, *c, d*) и построена первая гидратная оболочка мочевины (рис. 6, *e*), а также рассмотрен димер воды (рис. 6, *f*).

Энергии межмолекулярного взаимодействия рассчитывались с учетом базисной суперпозиционной ошибки ($BSSE$) [58]. Мы рассчитали энтальпию ассоциации всех шести комплексов для температур $T = 0$ и $T = 310.15\,\mathrm{K}$ по формуле

$$\Delta H_T^0 = \Delta E + \Delta ZPE + BSSE + \Delta H_{\mathrm{term}}, \qquad (5)$$

где ΔE — разность полных электронных энергий комплекса и мономеров, ΔZPE — разность нулевых колебательных энергий, $BSSE$ — суперпозиционная ошибка, ΔH_{term} — температурная термодинамическая поправка, вычисленная по формулам [55]. Константу равновесия K_T рассчитали по формуле

$$K_T = \exp\Big(-\frac{\Delta G^0}{RT}\Big), \qquad (6)$$

где ΔG^0 — изменение свободной энергии Гиббса, R — газовая постоянная, T — температура. Численные значения этих параметров приведены в табл. 2.

Обсуждение результатов

Экспериментальные данные (рис. 7) показывают, что 50 %-раствор мочевины является достаточно эффективным ОПА для кожи человека и имеет ЭОП, сравнимый с растворами рибозы и сахарозы. Полученное значение хорошо согласуется с линейной регрессионной зависимостью между ЭОП и энергией межмолекулярного взаимодействия.

Молекулярное моделирование, проведенное с помощью полноатомной молекулярной динамики, показывает, что в молекулярный карман пептида коллагена могут помещаться сразу две молекулы мочевины и образовывать при этом димерные структуры (рис. 4, *a*). Молекулы мочевины взаимодействуют с коллагеном путем образования четырех водородных связей. Первая молекула мочевины (левая на рис. 5) образует одну водородную связь с протоном гидроксильной группы гидроксипролина одной цепи, а вторую с карбонильной группой пролина другой цепи. Вторая молекула мочевины образует связи с протоном гидроксильной группы гидроксипролина и с карбонильной группой глицина одной цепи. Кроме этого, молекулы мочевины образуют водородную связь между собой через аминогруппы.

Из анализа данных, приведенных в табл. 2, видно, что коллаген сильнее взаимодействует с мочевиной, чем с молекулами воды. Энтальпия ассоциации коллагена с мочевиной ($-41.3\,\mathrm{kJ/mol}$) более отрицательная, чем с

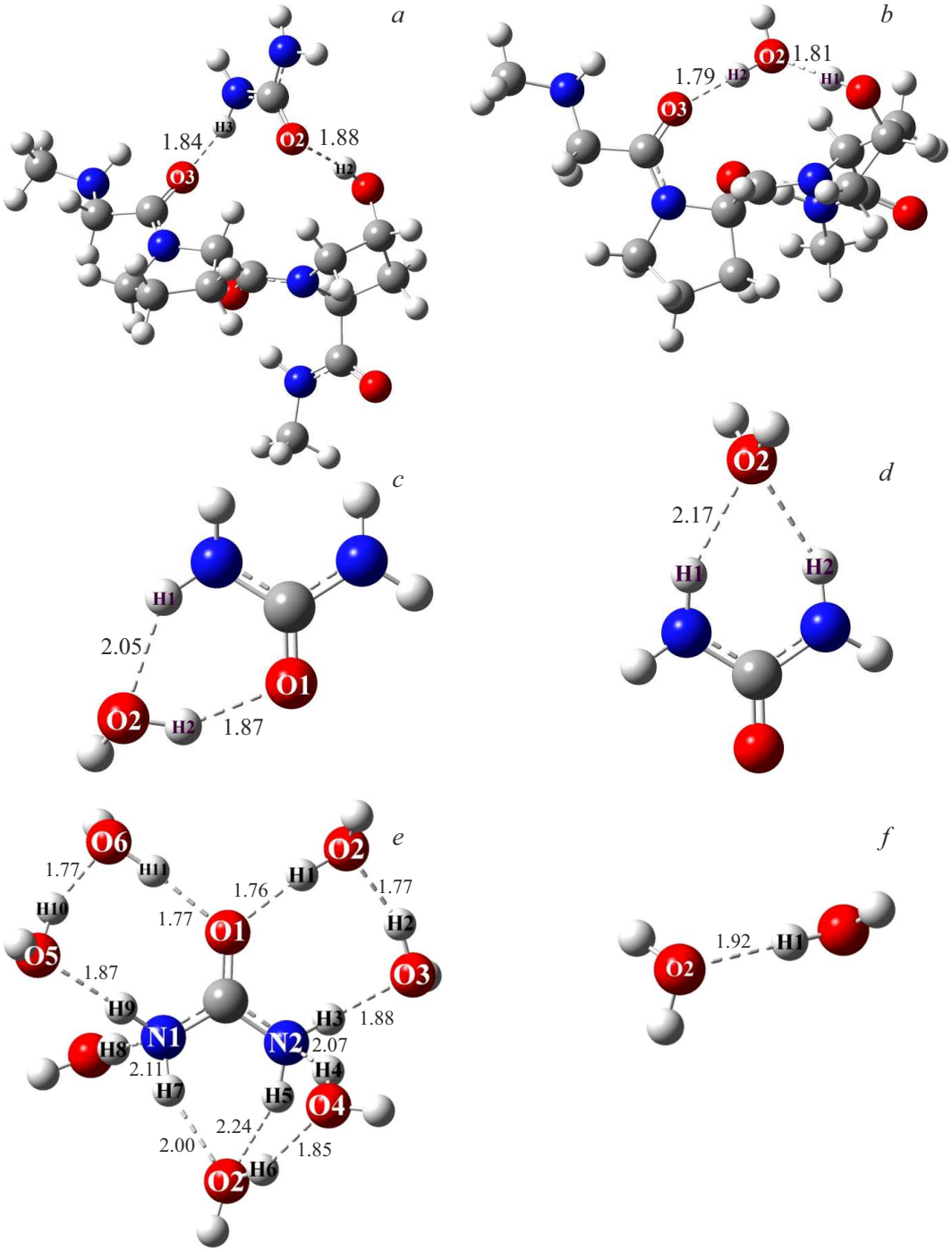

Рис. 6. Молекулярные модели комплексов, рассчитанные методом wB97XD/6-311G+(d,p): *a* — мочевина с цепочкой из трех аминокислотных остатков пролина, гидроксипролина и глицина (GPH); *b* — GPH. . .H_2O; *c, d* — мочевина. . .H_2O; *e* — первая гидратная оболочка молекулы мочевины; *f* — димер воды. Штриховыми линиями показаны водородные связи. Указаны длины водородных связей (в ангстремах) и атомы, участвующие в образовании водородной связи.

водой (−37.0 kJ/mol), что указывает на более энергетически выгодное связывание с мочевиной. Также константа равновесия для комплекса с мочевиной (0.68) выше, чем для комплекса с водой (0.13), что говорит о большей стабильности комплекса с мочевиной. Таким образом, мочевина составляет большую конкуренцию молекулам воды, замещая ее в окрестности коллагена. Это может приводить к вытеснению молекул воды из гидратной оболочки коллагена, нарушая ее структуру, что согласуется с известным денатурирующим эффектом мочевины. Энтальпии ассоциации моногидратов мочевины −35.6 и −21.6 kJ/mol меньше по модулю, чем у комплекса

Таблица 2. Термодинамические параметры межмолекулярных комплексов (в kJ/mol) и константы равновесия, вычисленные с учетом *BSSE* методом wB97XD/6-311+G(d,p)

Молекулярный комплекс	*BSSE*	ΔZPE	ΔE	ΔH_0^0	$\Delta H_{310.15}^0$	$T\Delta S$	$K_{310.15}$
GPH... H_2O	7.5	9.7	−51.7	−34.5	−37.0	−42.3	1.3E−01
GPH... мочевина	4.4	3.3	−51.2	−43.5	−41.3	−42,3	6.8E−01
Димер H_2O	3.4	10.0	−26.4	−13.0 13.22 ± 0.12[1] [59]	−15.4 15.454 ± 0.074[2] [60]	−28.0	7.6E−03
Мочевина... H_2O[3]	2.7	9.7	−45.6	−33.2	−35.6	−37.3	5.2E−01
Мочевина... H_2O[4]	3.5	6.6	−31.8	−21.6	−21.6	−32.0	1.8E−02
Мочевина... $(H_2O)_7$	35.0[5]	72.9	−316.4	−208.6 −29.8[6]	–	–	–

Примечание. [1] Оригинальное экспериментальное значение $1105 \pm 10\,\text{cm}^{-1}$ переведено в единицы kJ/mol. [2] Значение получено с помощью активных термохимических таблиц. [3] Структура моногидрата мочевины (рис. 7, *c*). [4] Структура моногидрата мочевины (рис. 7, *d*). [5] Параметр *BSSE* рассчитывался методом парциальной *BSSE*, когда складываются значения, вычисленные для каждой молекулы воды. [6] Значение в расчете на одну молекулу воды.

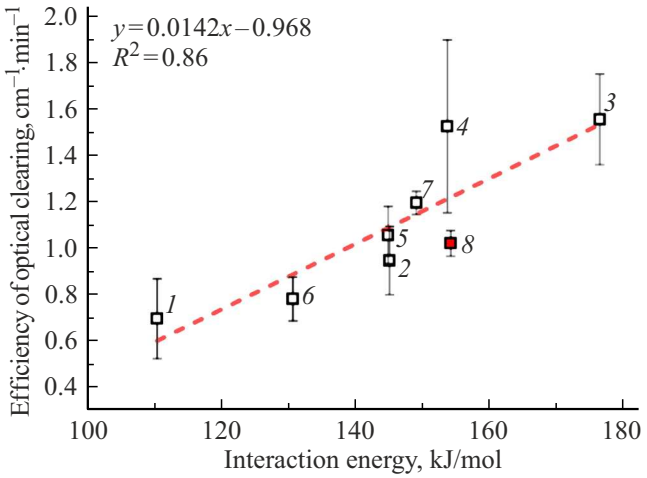

Рис. 7. Зависимость ЭОП кожи человека *in vivo* от энергии межмолекулярного взаимодействия фрагмента пептида коллагена $((GPH)_3)_2$ и различных видов ОПА [38,39]: глицерин (*1*), рибоза (*2*), глюкоза (*3*), фруктоза (*4*), сахароза (*5*), глюкозамин (*6*), йогексол (*7*), мочевина (*8*). Линейная аппроксимация указана штриховой линией и выражена в виде уравнения.

GPH...мочевина. Полная первая гидратная оболочка молекулы мочевины, согласно моделированию, имеет семь молекул воды. Присоединение следующей молекулы воды в любое структурное положение приводит к образованию мостика из молекулы воды, уже не связанной напрямую с молекулой мочевины и относящейся уже ко второй гидратной оболочке. Энтальпия, приходящаяся на одну молекулы воды, составляет −29.8 kJ/mol, что тоже уступает комплексу GPH...мочевина. Это означает, что при взаимодействии с коллагеном мочевина может частично терять свою гидратную оболочку. Связь между молекулами свободной воды значительно слабее, чем рассмотренные взаимодействия, поэтому мочевина легко осуществляет деструкцию водной структуры. То есть молекула мочевины, имея доноры и акцепторы протонов при образовании водородных связей, способна встраиваться в водную сеть и разрушать ее. Это приводит к увеличению подвижности молекул воды и снижению общей упорядоченности водной структуры. Вода становится менее структурированной, что влияет на ее свойства. Это позволяет молекулам мочевины приблизиться к поверхности коллагена. Дальше мочевина конкурирует с водой за образование водородных связей с коллагеном. Поскольку мочевина может образовывать более прочные водородные связи с некоторыми частями коллагена, она вытесняет молекулы воды из гидратной оболочки. Это приводит вначале к увеличению объема коллагена за счет обратимой диссоциации (расстояние между микрофибриллами увеличивается). Это подтверждается результатами моделирования, представленными на рис. 8, *a*. Дальше при значительных концентрациях (от 25% и выше) и более значительных временах взаимодействия (порядка сотен наносекунд) происходит денатурация (разворачивание тройной спирали микрофибрилл) коллагена. Надо заметить, что при наложении на кожу 50%-водного раствора мочевины в область дермы проникает единицы процентов. Поэтому никакой денатурации коллагена не происходит. С учетом этого времена моделирования для построения графика на рис. 8 были взяты небольшими. Данные, представленные на рис. 8, носят качественный характер и показывают как разные иммерсионные агенты влияют на объем коллагена.

Из рис. 8 видно, что в результате деструкции водной структуры происходит увеличение объема коллагена, что также визуально видно на рис. 4, *b*, *c*. То есть происходит процесс обратимой диссоциация микрофибрилл коллагена. Эти структурные изменения влияют на уменьшения показателя преломления коллагена за счет снижения концентрации коллагена, уменьшается разность с показателем преломления межклеточной жидкости, смешанной с иммерсионным агентом, что

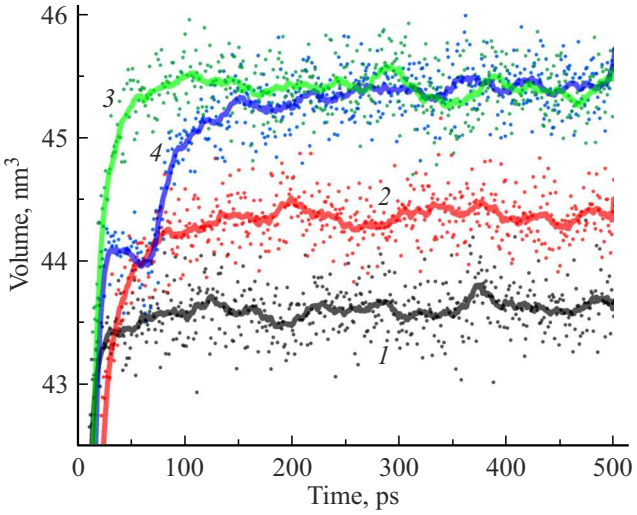

Рис. 8. Зависимость изменения объема пептида коллагена от времени воздействия ОПА: без ОПА (чистая вода) (*1*), 50 %-водный раствор мочевины (*2*), 60 %-водные растворы глицерина (*3*) и йогексола (*4*) [38].

соответственно положительно влияет на процесс ОП кожи.

Заключение

На основании экспериментальных *in vivo* данных определена ЭОП кожи человека 50 %-водным раствором мочевины. Проведенное комплексное молекулярное моделирование взаимодействия мочевины с модельным пептидом коллагена показало, что полученные параметры для мочевины хорошо согласуются с линейной регрессией между энергией межмолекулярного взаимодействия и ЭОП кожи человека. Это позволяет использовать регрессионное уравнение в предсказательных целях. Мочевина образует более стабильные комплексы с коллагеном, чем вода, и может эффективно вытеснять воду из гидратной оболочки коллагена, нарушая структуру водородных связей и приводя к обратимой диссоциации структур коллагена и соответственно к снижению показателя преломления. Таким образом, чем быстрее происходит процесс диффузии и чем больше энергия ассоциации иммерсионного агента с коллагеном, тем выше ЭОП. Молекула мочевины имеет стабильную гидратную оболочку, но ее взаимодействие с коллагеном (исходя из результатов моделирования) оказывается термодинамически более выгодным, чем сохранение полной гидратной оболочки. С помощью проведенного исследования уточнено значение параметров уравнения линейной регрессии.

Полученные результаты создают основу для разработки новых неинвазивных методик улучшения визуализации кожных и подкожных структур в клинической практике. В частности, методика может быть полезна: в дерматологии — для более точной диагностики кожных новообразований и воспалительных процессов с помощью ОКТ; в лазерной терапии и косметологии — для увеличения глубины проникновения лазерного излучения при минимизации рассеяния; при мониторинге микроциркуляции и состояния коллагенового матрикса в рамках оценки заживления ран, фиброза и возрастных изменений кожи.

Использование мочевины как компонента просветляющего агента является привлекательным, поскольку она уже применяется в дерматологических препаратах (включая медицинские кремы и мази) и обладает известным профилем безопасности при наружном применении.

Несмотря на продемонстрированную эффективность, использование высококонцентрированных растворов мочевины сопряжено с рядом ограничений. Потенциальное раздражение кожи: при длительном воздействии или повышенной чувствительности возможно развитие раздражения или гиперемии, особенно при нарушении целостности кожного покрова. Эффект ОП временный и зависит от степени гидратации тканей, концентрации агента и времени экспозиции. Индивидуальные особенности кожи: толщина, плотность коллагена и гидратация варьируют у разных пациентов, что требует персонализированного подхода к выбору концентрации и времени экспозиции.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта (№ 23-14-00287) Российского научного фонда.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] V.V. Tuchin. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics*, 3rd ed. (SPIE Press, Bellingham, WA, 2015). DOI: 10.1117/3.1003040

[2] H. Jonasson, I. Fredriksson, S. Bergstrand, C.J. Östgren, M. Larsson, T. Strömberg. J. Biomed. Opt., **23** (12), 121608 (2018). DOI: 10.1117/1.JBO.23.12.121608

[3] *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, ed. by V.V. Tuchin, D. Zhu, E.A. Genina (Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, FL, 2022). DOI: 10.1201/9781003025252

[4] J.M. Hirshburg. *Chemical agent induced reduction of skin light scattering: doctoral dissertation* (Texas A & M University, 2009).

[5] D. Zhu, K.V. Larin, Q. Luo, V.V. Tuchin. Laser Photonics Rev., **7** (5), 732 (2013). DOI: 10.1002/lpor.201200056

[6] A.N. Bashkatov, K.V. Berezin, K.N. Dvoretskiy, M.L. Chernavina, E.A. Genina, V.D. Genin, V.I. Kochubey, E.N. Lazareva, A.B. Pravdin, M.E. Shvachkina, P.A. Timoshina, D.K. Tuchina, D.D. Yakovlev, D.A. Yakovlev,

I.Yu. Yanina, O.S. Zhernovaya, V.V. Tuchin. J. Biomed. Opt., **23** (9), 091416 (2018). DOI: 10.1117/1.JBO.23.9.091416
[7] M. Kirillin, I. Meglinski, V. Kuzmin, E. Sergeeva, R. Myllylä. Opt. Express, **18** (21), 21714 (2010). DOI: 10.1364/OE.18.021714
[8] I. Meglinski, M. Kirillin, V. Kuzmin, R. Myllylä. Opt. Lett., **33** (14), 1581 (2008). DOI: 10.1364/OL.33.001581
[9] И.В. Меглинский, В.Л. Кузьмин, А.В. Приезжев. Квант. электрон., **36** (11), 989 (2006). [I.V. Meglinskii, V.L. Kuz'min, A.V. Priezzhev. Quant. Electron., **36** (11), 989 (2006). DOI: 10.1070/QE2006v036n11ABEH013458].
[10] L. Oliveira, V.V. Tuchin. *The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering* (Basel: Springer Nature Switzerland AG, 2019). DOI: 10.1007/978-3-030-33055-2
[11] I. Costantini, R. Cicchi, L. Silvestri, F. Vanzi, F.S. Pavone. Biomed. Opt. Express, **10** (10), 5251 (2019). DOI: 10.1364/boe.10.005251
[12] P. Matryba, L. Kaczmarek, J. Gołąb. Laser Photonics Rev., **13** (8), 1800292 (2019). DOI: 10.1002/lpor.201800292
[13] T. Yu, J. Zhu, D. Li, D. Zhu. iScience, **24** (3), 102178 (2021). DOI: 10.1016/j.isci.2021.102178
[14] I.S. Martins, H.F. Silva, E.N. Lazareva, N.V. Chernomyrdin, K.I. Zaytsev, L.M. Oliveira, V.V. Tuchin. Biomed. Opt. Express, **14** (1), 249 (2023). DOI: 10.1364/BOE.479320
[15] T. Kamali, A. Doronin, T. Rattanapak, S. Hook, I. Meglinski. Laser Phys. Lett., **9** (8), 607 (2012). DOI: 10.7452/lapl.201210046
[16] S.G. Proskurin, I.V. Meglinski. Laser Phys. Lett., **4** (11), 824 (2007). DOI: 10.1002/lapl.200710056
[17] E.C. Cheshire, R.D.G. Malcomson, S. Joseph, A. Adnan, D. Adlam, G.N. Rutty. Int. J. Legal Med., **131**, 1377 (2017). DOI: 10.1007/s00414-017-1570-1
[18] T. Yu, J. Zhu, Y. Li, Y. Ma, J. Wang, X. Cheng, S. Jin, Q. Sun, X. Li, H. Gong, Q. Luo, F. Xu, S. Zhao, D. Zhu. Sci. Rep., **8** (1), 1964 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-20306-3
[19] L. Chen, G. Li, Y. Li, Y. Li, H. Zhu, L. Tang, P. French, J. McGinty, Sh. Ruan. Sci. Rep., **7**, 12218 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-12484-3
[20] H. Soleimanzad, M. Juchaux, H. Gurden, D. Crepin, F. Pain. Proc. SPIE, **11226**, 1122614 (2020). DOI: 10.1117/12.2544298
[21] M.S. Lai, W.M. Chick, M.H. Law, R.Ch. Chang. Sci. Rep., preprint (2025). DOI: 10.21203/rs.3.rs-6517663/v1
[22] X. Wen, S.L. Jacques, V.V. Tuchin, D. Zhu. J. Biomed. Opt., **17** (6), 066022 (2012). DOI: 10.1117/1.JBO.17.6.066022
[23] A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V.V. Tuchin. *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues*, ed. by V.V. Tuchin (Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009), ch. 21. DOI: 10.1201/9781584889755
[24] К.В. Ларин, В.В. Тучин. Квант. электрон., **38** (6), 551 (2008). [K.V. Larin, V.V. Tuchin. Quant. Electron., **38** (6), 551 (2008). DOI: 10.1070/QE2008v038n06ABEH013850].
[25] D.K. Tuchina, R. Shi, A.N. Bashkatov, E.A. Genina, D. Zhu, Q. Luo, V.V. Tuchin. J. Biophotonics, **8** (4), 332 (2015). DOI: 10.1002/jbio.201400138
[26] V. Hovhannisyan, P.-S. Hu, S.-J. Chen, C.-S. Kim, C.-Y. Dong. J. Biomed. Opt., **18** (4), 046004 (2013). DOI: 10.1117/1.JBO.18.4.046004
[27] A.Yu. Sdobnov, M.E. Darvin, E.A. Genina, A.N. Bashkatov, J. Lademann, V.V. Tuchin. Spectrochimica Acta A, **197**, 216 (2018). DOI: 10.1016/j.saa.2018.01.085
[28] A.T. Yeh, B. Choi, J.S. Nelson, B.J. Tromberg. J. Inv. Derm., **121** (6), 1332 (2003). DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12634.x
[29] Z. Ou, Yi-Sh. Duh, N.J. Rommelfanger, C.H.C. Keck, Sh. Jiang, K. Brinson Jr., S. Zhao, E.L. Schmidt, X. Wu, F. Yang, B. Cai, H. Cui, W. Qi, Sh. Wu, A. Tantry, R. Roth, J. Ding, X. Chen, J.A. Kaltschmidt, M.L. Brongersma, G. Hong. Science, **385** (6713), eadm6869 (2024). DOI: 10.1126/science.adm686
[30] V.V. Tuchin, D.M. Zhestkov, A.N. Bashkatov, E.A. Genina. Optics Express, **12** (13), 2966 (2004). DOI: 10.1364/OPEX.12.002966
[31] V.V. Tuchin. *Optical Clearing of Tissues and Blood* (SPIE Press, Bellingham, WA, 2005). DOI: 10.1117/3.637760
[32] O. Sydoruk, O. Zhernovaya, V. Tuchin, A. Douplik. J. Biomed. Opt., **17** (11), 115002-1-6 (2012). DOI: 10.1117/1.JBO.17.11.115002
[33] O. Zhernovaya, V.V. Tuchin, M.J. Leahy. J. Biomed. Opt., **18** (2), 026014-1-8 (2013). DOI: 10.1117/1.JBO.18.2.026014
[34] O.S. Zhernovaya, E.A. Genina, V.V. Tuchin, A.N. Bashkatov. *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, ed. by V.V. Tuchin, D. Zhu, E.A. Genina (Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, Boca Raton, FL, 2022). P. 383–392. DOI: 10.1201/9781003025252
[35] T. Yu, X. Wen, V.V. Tuchin, Q. Luo, D. Zhu. J. Biomed. Opt., **16** (9), 095002 (2011). DOI: 10.1117/1.3621515
[36] X. Wen, Z. Mao, Z. Han, V.V. Tuchin, D. Zhu. J. Biophotonics, **3** (1–2), 44 (2010). DOI: 10.1002/jbio.200910080
[37] A.Yu. Sdobnov, M.E. Darvin, J. Schleusener, J. Lademann, V.V. Tuchin. J. Biophotonics, **12** (5), e201800283 (2019). DOI: 10.1002/jbio.201800283
[38] K.V. Berezin, E.V. Grabarchuk, A.M. Lichter, K.N. Dvoretski, V.V. Tuchin. J. Biophotonics, **17** (2), e202300354 (2024). DOI: 10.1002/jbio.202300354
[39] К.В. Березин, Е.В. Грабарчук, А.М. Лихтер, К.Н. Дворецкий, Ю.И. Сурков, В.В. Тучин. ЖТФ, **94** (3), 515 (2024). DOI: 10.61011/JTF.2024.03.57392.318-23 [K.V. Berezin, E.V. Grabarchuk, A.M. Lichter, K.N. Dvoretski, Yu.I. Surkov, V.V. Tuchin. Techn. Phys., **69** (3), 485 (2024). DOI: 10.21883/0000000000].
[40] C.C.J. Roothaan. Rev. Mod. Phys., **23** (2), 69 (1951). DOI: 10.1103/RevModPhys.23.69
[41] D.J. Faber, F.J. van der Meer, M.C.G. Aalders, T.G. van Leeuwen. Opt. Express, **12** (19), 4353 (2004). DOI: 10.1364/OPEX.12.004353
[42] P. Lee, W. Gao, X. Zhang. Appl. Opt., **49** (18), 3538 (2010). DOI: 10.1364/AO.49.003538
[43] E.A. Genina, A.N. Bashkatov, E.A. Kolesnikova, M.V. Basko, G.S. Terentyuk, V.V. Tuchin. J. Biomed. Opt., **19** (2), 021109 (2014). DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.021109
[44] R.K. Wang, V.V. Tuchin. *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods. Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring, and Material Science*. V. 2, 2nd ed., ed. by V.V. Tuchin (Berlin, Heidelberg, N.Y.: Springer-Verlag, 2013). P. 665. DOI: 10.1007/978-1-4614-5176-1
[45] Э.А. Генина, Н.С. Ксенофонтова, А.Н. Башкатов, Г.С. Терентюк, В.В. Тучин. Квант. электрон., **47** (6), 561 (2017). [E.A. Genina, N.S. Ksenofontova, A.N. Bashkatov, G.S. Terentyuk, V.V. Tuchin. Quant. Electron., **47** (6), 561 (2017). DOI: 10.1070/QEL16378].
[46] K. Okuyama, K. Miyama, K. Mizuno, H.P. Bachinger. Biopolymers, **97** (8), 607 (2012). DOI: 10.1002/bip.22048

[47] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M.Jr. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman. J. Am. Chem. Soc., **117** (19), 5179 (1995). DOI: 10.1021/ja00124a002
[48] A.D. Becke. J. Chem. Phys., **98** (7), 5648 (1993). DOI: 10.1063/1.464913
[49] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr. Phys. Rev. B, **37** (2), 785 (1988). DOI: 10.1103/PhysRevB.37.785
[50] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel et al. *Gaussian09, Revision A.02* (Pittsburgh PA: Gaussian, Inc. 2009).
[51] D. Van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, E.A. Mark, H.J.C. Berendsen. J. Comput. Chem., **26** (16), 1701 (2005). DOI: 10.1002/jcc.20291
[52] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M.C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman. J. Comp. Chem., **24** (16), 1999 (2003). DOI: 10.1002/jcc.10349
[53] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak. J. Chem. Phys., **81** (8), 3884 (1984). DOI: 10.1063/1.448118
[54] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. J. Mol. Graph., **14** (1), 33 (1996). DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
[55] K.V. Berezin, K.N. Dvoretski, M.L. Chernavina, A.M. Likhter, V.V. Smirnov, I.T. Shagautdinova, E.M. Antonova, E.Yu. Stepanovich, E.A. Dzhalmuhambetova, V.V. Tuchin. J. Mol. Modeling., **24** (2), 45 (2018). DOI: 10.1007/s00894-018-3584-0
[56] O. Trott, A.J. Olson. J. Comput. Chem., **31** (2), 455 (2010). DOI: 10.1002/jcc.21334
[57] J.-D. Chai, M. Head-Gordon. J. Chem. Phys., **128** (8), 084106 (2008). DOI: 10.1063/1.2834918
[58] S. Simon, M. Duran, J.J. Dannenberg. J. Chem. Phys., **105** (24), 11024–11031 (1996). DOI: 10.1063/1.472902
[59] B.E. Rocher-Casterline, L.C. Ch'ng, A.K. Mollner, H. Reisler. J. Chem. Phys., **134** (21), 211101 (2011). DOI: 10.1063/1.3598339
[60] B. Ruscic. J. Phys. Chem. A, **117** (46), 11940 (2013). DOI: 10.1021/jp403197t