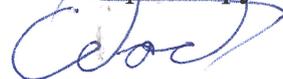


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи



Сдобнов Антон Юрьевич

ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ КОЖИ МЕТОДАМИ  
МНОГОФОТОННОЙ ТОМОГРАФИИ И СПЕКТРОСКОПИИ  
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙНИЯ

03.01.02 – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
д.ф.-м.н., профессор В.В. Тучин

Саратов 2021

# Оглавление

<b>Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>Глава 1 Структура и оптические свойства кожи. Оптическое просветление кожи. ....</b>	<b>12</b>
1.1 Структура и оптические свойства кожи.....	12
1.2 Оптическое просветление кожи.....	19
1.3 Исследование оптического просветления кожи методами двух-фотонной и многофотонной томографии.....	23
1.4 Исследование оптического просветления методом спектроскопии комбинационного рассеяния.....	30
<b>Глава 2. Исследование оптического просветления кожи ex vivo с использованием двух-фотонной томографии.....</b>	<b>36</b>
2.1 Материалы и методы.....	36
2.1.1 Подготовка образцов кожи.....	36
2.1.2 Оптические просветляющие агенты.....	37
2.1.3 Экспериментальная установка.....	39
2.1.4 План эксперимента.....	40
2.2 Результаты и их обсуждение.....	41
2.3 Выводы.....	50
<b>Глава 3. Исследование влияния оптического просветления кожи на гидратацию коллагена.....</b>	<b>52</b>
3.1 Материалы и методы.....	53

3.1.1 Подготовка образцов кожи.....	53
3.1.2 Оптические просветляющие агенты.....	54
3.1.3 Экспериментальная установка.....	54
3.1.4 План эксперимента.....	55
3.1.5 Статистический анализ.....	56
3.2 Результаты и их обсуждение.....	56
3.3. Выводы.....	67
<b>Глава 4 Исследование влияния оптического просветления на различные типы водородных связей в коже .....</b>	<b>68</b>
4.1 Материалы и методы.....	69
4.1.1 Подготовка образцов кожи.....	69
4.1.2 Оптические просветляющие агенты.....	70
4.1.3 Экспериментальная установка.....	70
4.1.4 План эксперимента.....	71
4.2. Обработка данных.....	72
4.2.1 Деконволюция спектров комбинационного рассеяния .....	72
4.2.2 Статистический анализ.....	75
4.3. Результаты и их обсуждение.....	75
4.4 Выводы.....	86
<b>Заключение.....</b>	<b>88</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>91</b>

# Введение

## Актуальность исследования

Кожа – это внешний орган, покрывающий тело позвоночных животных, являющийся барьером между живым организмом и окружающей его средой [1, 2]. Кожа выполняет ряд важных функций, в первую очередь предоставляя защиту внутреннего организма от внешних механических воздействий, а также предотвращая проникновение патогенов. Помимо этого, кожа также участвует в дыхании, регуляции испарения воды, терморегуляции и в обменных процессах [3–5]. Более того, кожа является самым большим органом человека. Таким образом, изучение ее структуры, исследование изменений связанных со старением, мониторинг и контроль проникновения лекарственных препаратов, а также возможность раннего детектирования развития кожных болезней являются актуальными и важными задачами для современной биомедицины и дерматологии.

При обследовании кожного покрова дерматологом, первичная оценка состояния пациента проводится, как правило, визуально «на глаз». Тем не менее, для осуществления точной диагностики кожных заболеваний (в том числе онкологии) необходимо исследовать образцы биопсий. Биопсия является инвазивной и достаточно болезненной процедурой для пациента, фактически представляющей собой мини-операцию. Таким образом, разработка неинвазивных методов диагностики кожных заболеваний, методов изучения процессов старения кожи, а также методов мониторинга проникновения и воздействия лекарственных препаратов на те или иные структуры кожи, является перспективным и актуальным направлением для современных научных исследований.

На данный момент, для решения описанных выше задач, используется большой спектр неинвазивных оптических методов исследования кожи *in vivo*. В их

числе такие методы как лазерная спекл-визуализация [6, 7], многофотонная томография (МФТ) [8–11] оптическая когерентная томография (ОКТ) [12, 13], флуоресцентная спектроскопия [14, 15], лазерная сканирующая микроскопия [16–18], спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) [19–23], и т.д. Наибольший интерес для клинических исследований представляет совместное использование нескольких различных оптических методов, так называемая мульти-модальная визуализация [24]. Подобный подход позволяет одновременно получать информацию об исследуемом биологическом объекте как на функциональном, так и на молекулярном уровнях, что в значительной степени позволяет увеличить эффективность диагностики и последующего контроля лечения кожных заболеваний. На данный момент активно используются такие мульти-модальные методы исследования кожного покрова как комбинированное использование ОКТ и МФТ [25], а также ОКТ и фотоакустической (ФА) томографии (ФАТ) [26]. Совместное использование терагерцовой импульсной и поляризационной визуализации позволило классифицировать клетки немеланомного рака кожи [27]. Конфокальная рефлектометрия, комбинированная с автофлуоресцентной томографией позволила диагностировать рак кожи на ранних стадиях [28]. Следует заметить, что при исследовании кожи методом МФТ, часто используется совмещение независимых каналов детектирования, таких как автофлуоресценция (АФ) (при возбуждении на разных длинах волн), время жизни АФ, генерация второй гармоники (ГВГ), когерентная антистоксова спектроскопия КР (КАСКР) липидов и воды, что обеспечивает высокую эффективность таких измерений [29–33].

Тем не менее, все описанные выше оптические методы визуализации и исследования кожного покрова имеют критическое ограничение, не позволяющее получать информацию из глубоких слоев кожи в видимом и инфракрасном диапазоне длин волн. Данное ограничение связано с тем, что роговому слою и живому эпидермису кожного покрова характерно очень сильное рассеяние света. В

то же время, глубокие слои кожи, такие как дерма и гипердерма, также обладают достаточно большими коэффициентами рассеяния, в десятки и сотни раз превышающие коэффициенты поглощения [34]. С целью увеличения глубины детектирования посредством оптических методик, а также для улучшения пространственного разрешения и контраста получаемых изображений, в 90-е годы прошлого века был разработан метод оптического просветления (ОП) [34–37]. Влияние различных оптических просветляющих агентов (ОПА), таких как глицерин [38], глюкоза [39, 40], диметилсульфоксид (ДМСО) [41], и т.д., на кожу и другие биологические ткани были исследованы с помощью широкого ряда оптических методов, таких как ОКТ [42, 43], МФТ [44, 45], спектроскопия КР [46–48], ФАТ [49–54], ФА пролетной цитометрии (ФАПЦ) [55], и т.д. Тем не менее, вопрос воздействия ОПА на кожный покров и его составляющие (в частности коллаген) остается открытым. Помимо этого, также недостаточно исследовано воздействие ОПА на воду входящую в состав кожи. Решение выше обозначенных проблем и вопросов актуально, что и определило цель настоящей диссертационной работы.

**Целью диссертационной работы** является экспериментальное исследование воздействия оптических просветляющих агентов на кожу и различные ее составляющие, такие как коллаген и вода.

**Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:**

1. Исследование кинетики оптического просветления свиной кожи *ex vivo* под действием биосовместимых гиперосмотических иммерсионных агентов (глицерин и Омнипак (Йогексол)).
2. Исследование изменения сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники кожи после применения оптических просветляющих агентов.
3. Исследование изменения спектров комбинационного рассеяния кожи после применения оптических просветляющих агентов.

4. Исследование изменения гидратации коллагена в коже после применения оптических просветляющих агентов.
5. Исследование изменения содержания различных типов воды в коже в зависимости от силы водородной связи после применения оптических просветляющих агентов.

### **Объекты исследования:**

Объектом исследования данной диссертационной работы являлись образцы свиной кожи, взятые с ушей. Исследования на данных образцах проходили с соблюдением необходимых нормативных актов и рекомендаций комитета по этике (Ветеринарная комиссия, район Берлина Трептов-Копеник, Германия).

### **Научная новизна работы:**

Впервые было изучено влияние оптического просветляющего агента Омнипак на изменение сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники кожи.

Впервые было изучено влияние оптического просветляющего агента Омнипак на спектры комбинационного рассеяния кожи.

Впервые было изучено влияние оптических просветляющих агентов глицерин и Омнипак на изменение гидратации коллагена.

Впервые было показано изменение содержания и соотношения различных типов воды в коже в зависимости от силы водородной связи после применения оптических просветляющих агентов.

### **Научная и практическая значимость работы:**

Результаты данной диссертационной работы развивают и дополняют теоретические и практические данные по эффективности применения метода оптического просветления для управления оптическими параметрами биологических тканей с целью повышения эффективности диагностики и терапии

различных заболеваний оптическими методами, а также способствуют дальнейшему развитию данного метода.

Мониторинг изменения содержания воды в коже после применения оптического просветления может значительно улучшить качество диагностирования кожных заболеваний, а также улучшить точность при проведении хирургических операций.

Были разработаны подходы, способствующие поиску оптического просветляющего агента, а также его концентрации и времени воздействия, обеспечивающие эффективное и безопасное оптическое просветление кожи в клинических условиях.

### **Основные результаты и положения, выносимые на защиту:**

1. Местное 60-ти минутное воздействие рентгеноконтрастного вещества йогексола-300 на свиную кожу *ex vivo* вызывает увеличение сигнала автофлуоресценции до  $1.50 \pm 0.05$  раза, сигнала генерации второй гармоники до  $3.00 \pm 0.03$  раз, а также интенсивности характерных молекулярных линий спектра комбинационного рассеяния на  $937 \text{ см}^{-1}$ ,  $1003 \text{ см}^{-1}$ ,  $1244 \text{ см}^{-1}$ ,  $1272 \text{ см}^{-1}$ ,  $1426 \text{ см}^{-1}$  и  $1665 \text{ см}^{-1}$  до  $1.40 \pm 0.03$ ,  $1.43 \pm 0.04$ ,  $1.45 \pm 0.04$ ,  $1.52 \pm 0.05$ ,  $1.44 \pm 0.03$  и  $1.51 \pm 0.04$  раз, соответственно.

2. Местное применение йогексола-300 вызывает значительно меньшую дегидратацию как коллагена (не более  $1.18 \pm 0.09$  раза), так и всей кожной ткани (не более  $1.21 \pm 0.06$  раза), по сравнению с 70% водным раствором глицерина ( $1.66 \pm 0.07$  и  $2.26 \pm 0.05$  раз, соответственно), что делает данный агент перспективным для дальнейших клинических исследований, в том числе и для мультимодальной визуализации.

3. Изменение распределения по глубине как общего содержания воды в коже, так и содержания компонентов воды, характеризуемых различной силой водородной связи, в процессе применения оптических просветляющих агентов с

различной осмолярностью можно определять методом деконволюции при использовании функций Гаусса, описывающих высокочастотные спектры комбинационного рассеяния кожи, измеренные на конфокальном спектрометре.

### **Личный вклад автора диссертации:**

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных измерений и исследований, обработке полученных данных, анализе и обсуждении результатов, а также в написании научных статей и апробации результатов проведенных исследований на конференциях и симпозиумах.

Формулировка темы диссертационной работы, постановка исследовательских задач, обсуждение результатов, оказание помощи в подготовке статей к публикации и обсуждение текста диссертационной работы, ее основных положений и выводов, осуществлялась заведующим кафедрой оптики и биофотоники, профессором физического факультета, ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», д.ф.-м.н., профессором Тучиным В.В.- руководителем диссертационной работы.

### **Достоверность научных результатов:**

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, использованием апробированных моделей и методов измерений, согласованностью с результатами независимых исследований других авторов, широкой апробацией результатов.

### **Апробация работы:**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 6 международных научных конференциях:

Saratov Fall Meeting (с 2016 по 2020 год), Саратов, Российская Федерация.  
International Conference on Laser Applications in Life Science (LALS) (2018), Бар Илан,  
Израиль.

### **Публикации:**

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 работ, из которых 5 – в реферируемых изданиях из списка SCOPUS, и 1 научная статья – в рецензируемом журнале из списка ВАК.

По результатам данной диссертационной работы опубликованы статьи в реферируемых журналах и изданиях:

### **Статьи в рецензируемых журналах из списка рекомендованных ВАК:**

1. **Сдобнов А.Ю., Ладемманн Ю., Дарвин, М.Е., Тучин В.В.** Методы молекулярной оптической визуализации в дерматологии при оптическом просветлении кожи // *Успехи биологической химии*. — 2019. — V.59. — P. 295-322.

### **Статьи в изданиях индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:**

2. **Sdobnov A., Darwin M. E., Lademann J., Tuchin V.** A comparative study of ex vivo skin optical clearing using two-photon microscopy // *Journal of Biophotonics*. — 2017. — V.10, № 9. — P. 1115–1123.

3. **Sdobnov A. Y., Tuchin V. V., Lademann J., Darwin M. E.** Confocal Raman microscopy supported by optical clearing treatment of the skin—influence on collagen hydration // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2017. — V.50, № 28. — P. 285401.

4. **Sdobnov A. Y., Darwin M. E., Schleusener J., Lademann J., Tuchin V. V.** Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy // *Journal of Biophotonics*. — 2019. — V.12, № 5. — P. e201800283.

5. *Sdobnov A. Y., Darwin M. E., Genina E. A., Bashkatov A. N., Lademann J., Tuchin V. V.* Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2018. — V.197. — P. 216–229.

### **Конкурсная поддержка работы:**

Исследования были поддержаны исследовательской программой Саратовского Национального Исследовательского Государственного Университета, грантом президента Российской Федерации НШ-7898.2016.2, грантом правительства Российской Федерации 14.Z50.31.0004, грантом правительства Российской Федерации 14.W03.31.0023, грантом правительства Российской Федерации 14.Z50.31.0044 и грантом Министерства Образования и Науки Российской Федерации 17.1223.2017/АР.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 126 страниц, включая список литературы, 18 рисунков и 5 таблиц. Список цитированной литературы содержит 295 наименований, включая публикации автора по теме диссертации.

Работа выполнена на кафедре оптики и биофотоники ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им.Н.Г.Чернышевского». Экспериментальные данные были получены на кафедре дерматологии, венерологии и аллергологии медицинского университета Шаритэ (г. Берлин, Германия).

# Глава 1

## Структура и оптические свойства кожи.

### Оптическое просветление кожи.

#### 1.1 Структура и оптические свойства кожи

Кожа является внешним органом позвоночных животных, представляя собой соединительную ткань со сложной клеточно-волокнутой структурой. Кожа состоит из трех основных слоев: эпидермис (или кожица), дерма и подкожно-жировая клетчатка [36, 56–62].

Эпидермис является внешним слоем кожи, выполняющим роль защитного барьера между окружающей средой и организмом. Эпидермис включает в свой состав пять подслоев [58–63]. Самый нижний из них – базальная мембрана, отделяющая эпидермис от дермы. Базальная мембрана представляет из себя ряд призматического эпителия. Над ним располагается шиповатый слой представляющий собой от 3 до 8 рядов клеток с цитоплазматическими выростами. Данный слой составляет основную массу эпидермиса и имеет толщину от 50 мкм до 150 мкм [58, 59]. Далее идет зернистый слой состоящий из 1-4 рядов клеток с суммарной толщиной 3 мкм [58, 59]. Затем следует блестящий слой состоящий из 2-4 рядов безъядерных клеток. Последним слоем является роговой слой, состоящий из чешуек толщиной 70-100 нм и длиной 10 мкм. Толщина рогового слоя может значительно варьироваться для различных областей на теле. Например, на ладони человека толщина рогового слоя не превышает 15 мкм, в то время как на подошве ноги она может достигать 600 мкм. Основной компонентой рогового слоя является кератин, составляющий около 50 % данного слоя.

Помимо механической защиты организма от внешних угроз, эпидермис также осуществляет иммунную защиту, предотвращая проникновение патогенов. Кроме этого, эпидермис также участвует в дыхании, регуляции испарения воды, терморегуляции, защите организма от ультра-фиолетового излучения и в обменных процессах [3–5].

Вторым и самым большим слоем кожи является дерма. Дерма представляет из себя соединительную ткань в основном состоящую из коллагеновых волокон (занимают около 70% сухого веса всей кожи) и внутритканевой жидкости содержащей полисахаридно-белковые комплексы, протеогликаны, белки и воду [58–64]. Толщина дермы может варьироваться в зависимости от части тела, в среднем составляя от 1.0 мм до 1.5 мм, и иногда достигая 3 мм [62, 63]. Дерма состоит из двух подслоев. Первый из них сосочковый слой, содержащий петли капилляров и нервные окончания. Второй слой – сетчатый слой. Он содержит фолликулы волос, коллагеновые и гладкомышечные волокна, нервные окончания, эластические волокна, а также кровеносные и лимфатические сосуды [60, 61].

Последним слоем кожи является подкожно-жировая клетчатка состоящая преимущественно из жировой и рыхлой соединительной ткани. Основная функция данного слоя заключается в обеспечении связи кожи с глубокими фасциями посредством соединительных волокон [65, 66]. Подкожно-жировая клетчатка также как и дерма содержит нервные окончания, волосяные фолликулы, кровеносные и лимфатические сосуды. Данный слой активно участвует в гомеостазе, защищая организм от потери тепла.

В число основных компонент поддерживающих структуру и механические свойства кожи входит вода [67]. Изучение гидратации кожи является одной из главных тем для исследования в современной дерматологии и косметологии [68, 69]. В ряде работ было показано, что роговой слой служит в качестве барьера препятствующего проникновению ксенобиотиков [70, 71], а также играет важную

роль в проникновении воды в кожу и ее испарении изнутри [72–75]. Содержание воды в коже сказывается на скорости диффузии препаратов и агентов нанесённых на кожный покров [76, 77]. Также, содержание воды влияет на факторы старения кожи. Важным объектом исследования для лучшего понимания процессов старения кожи, а также воздействия на компоненты кожи различными препаратами и агентами является изучение различных типов молекул воды [78, 79]. В частности, большинство молекул воды в коже связано с молекулами межклеточных липидов и белков за счет водородной связи. Данный тип воды получил название «связанная вода». Изменение содержания связанной воды влияет на эластичность кожи [80], ее патологическую и молекулярную структуру [81]. Также, малая часть воды в коже находится в свободном состоянии («несвязанная вода»). Ее содержание в основном зависит от общего физиологического и патологического состояния кожи, а также влажности окружающей среды [82–84].

Основными параметрами кожи отвечающими за ее оптические свойства и глубину ее зондирования при помощи оптических методов визуализации и диагностики являются рассеяние, поглощение и коэффициент преломления [85–87].

Поглощение характеризуется потерей световой энергии при взаимодействии с биологической тканью. Общепринято считать, что гемоглобин и меланин обеспечивают сильное поглощение света кожей [85–87].

Дерма кожи хорошо снабжается кровью, которая содержит гемоглобин – пигмент отвечающий за доставку кислорода [58]. Гемоглобин является основным поглотителем света в дерме. Гемоглобин здорового взрослого человека (Hb A) представляет из себя протеин, состоящий из четырех полипептидных цепей, каждая из которых связана в гемм [88]. Гемы, в свою очередь, являются основными поглотителями света в крови. Спектр поглощения Hb A содержит три характерные полосы поглощения. Первая полоса называется полосой Soret и находится в «синей» области спектра. Две оставшиеся полосы находятся в «зелено-желтом» регионе

спектра между 500 нм и 600 нм. Таким образом, из-за высокого поглощения на этих пиках Нв А имеет красный окрас.

Меланин, в основном, содержится в эпидермисе. Его спектр поглощения постепенно уменьшается от ультрафиолетовой области к инфракрасной. Не смотря на большое количество опубликованных научных работ, спектр поглощения меланина до сих пор слабо изучен [89–91]. На данный момент наибольшее распространение получила теория о том, что меланин состоит из набора беспорядочно расположенных олигомеров и полимеров различной формы. Из-за данной структуры возникает множественный ряд пиков поглощения, что в совокупности приводит к эффекту широкополосного поглощения [90, 92].

Помимо гемоглобина и меланина в сильном поглощении света кожей также участвуют хромофоры (билирубин и каротин [93]), жиры [93], клеточные ядра и белковые нити [94]. Не смотря на то, что вклад хромофоров в поглощение кожи можно рассматривать как отдельный фактор [95–97], обычно при моделировании процессов взаимодействия света с кожей его вклад объединяется в одну группу с остальными второстепенными факторами [98, 99].

Несмотря на обилие воды во всех биологических тканях, она не обладает значительным поглощением в видимой области спектра. Таким образом, поглощением воды определяются поглощающие свойства кожи в основном в спектральном диапазоне ближней инфракрасной области [36, 100, 101].

Рассеяние характеризуется изменением направления распространения, поляризации или фазы света. Обычно рассеяние рассматривается как эффект возникающий на поверхности объекта (также как отражение и преломление) или как взаимодействие с небольшой областью, оптические свойства которой отличаются от ее окружения. Было подсчитано, что лишь от 4% до 7% видимого света отражается

от поверхности кожи, в то время как весь оставшийся свет проникает внутрь [102, 103].

Основными компонентами кожи отвечающими за ее рассеяние являются белковые нити. Для эпидермиса белковые нити представлены кератином, в то время как для дермы они представлены коллагеном, который составляет 18%-30% от дермы [104]. Второстепенный вклад в рассеяние также вносят меланосомы, клеточные ядра и клеточные стенки [105–107].

Для биологических тканей, коэффициент рассеяния ( $\mu_s$ ) и параметр анизотропии рассеяния ( $g$ ) определяются разницей показателей преломления ( $n$ ) между клеточными компонентами этих тканей (например, органелл, мембран, ядер и т.д.) или склеропротеиновыми волокнистыми структурами дермы кожи, мышечными или хрящевыми тканями, а также межклеточными жидкостями [108]. На данный момент экспериментально измерены показатели преломления в видимом и инфракрасном диапазоне длин волн для широко ряда различных биологических тканей, а также их основных компонент (например, коллаген соединительных тканей [109], органеллы в клетках млекопитающих [110], оксигенированный и неоксигенированный гемоглобин [111, 112] и т.д.).

В таблицах 1 и 2 представлены литературные данные по измерению рассеяния, поглощения и показателя преломления кожи человека и свиньи.

Таблица 1. Коэффициенты рассеяния и поглощения слоев кожи человека и свиньи.

Биологическая ткань	Длина волны, нм	Поглощение, см <sup>-1</sup>	Рассеяние, см <sup>-1</sup>	Источник
Роговой слой человека	350	25.92	500	[113–117]
	400	17.28	500	
	450	11.63	500	
	500	10.47	500	
	550	9.83	500	
	600	8.67	500	

	650	8.21	500	
	700	8.15	500	
Эпидермис человека	350	9.99	210.4	[113–117]
	400	6.77	156.3	
	450	4.41	121.6	
	500	2.58	93.01	
	550	1.63	74.70	
	600	1.47	63.76	
	650	1.2	55.48	
	700	1.06	54.66	
Обескровленный эпидермис человека	450	5.13	134.9	[118]
	500	3.45	119.9	
	550	2.28	108.1	
	600	1.81	97.38	
	650	1.44	87.89	
	700	1.16	78.48	
	750	1.03	72.29	
	800	0.88	65.89	
Дерма человека	350	20.74	212.7	[113–117]
	400	13.82	159.9	
	450	9.31	124.1	
	500	8.37	92.24	
	550	7.86	77.22	
	600	6.94	63.09	
	650	6.57	55.98	
	700	6.52	53.62	
Обескровленная дерма человека	633	2.7	187	[116]
Обескровленная дерма человека	350	23.2	147.2	[119]
	400	9.5	136.1	
	450	6.3	130.8	
	633	2.7	90.3	
Дерма поросенка	632.8	0.89	289	[120]
	790	1.8	254	
	850	0.33	285	
Кожа поросенка (эпидермис + дерма)	632.8	1.0	492	[120]
	790	2.4	409	
	850	1.6	403	
Дерма свињи	900	0.06	282.6	[121]
	1000	0.12	270.4	
	1100	0.17	267.2	
	1200	1.74	263.9	
	1300	1.04	262.8	
	1400	9.11	246.2	
	1500	7.32	259.6	
Дерма свињи	325	5.6	220	[122]
	442	1.9	59	

	532	1.4	69	
	633	0.7	58	
	850	1.6	90	
	1064	3.1	26	
	1310	6.2	40	

Таблица 2. Показатели преломления слоев кожи человека и свиньи.

Биологическая ткань	Длина волны, нм	Показатель преломления	Источник
Роговой слой человека	400-700	1.55	[123]
Роговой слой человека	1300	1.51	[124]
Роговой слой человека	1300	1.47	[125]
Роговой слой человека	980	201	[126]
Эпидермис человека	980	1.34	[127]
Эпидермис человека	1300	1.43	[125]
Эпидермис человека	1300	1.34	[124]
Дерма человека	1300	1.41	[124]
Дерма человека	1300	1.41	[125]
Эпидермис человека	325	1,49	[128]
	442	1.45	
	532	1.45	
	633	1.453	
	850	1.42	
	1064	1.43	
	1310	1.42	
	1557	1.40	
Эпидермис человека	1300	1.39	[129]
Дерма человека	325	1.40	[128]
	442	1.44	
	532	1.38	
	633	1.39	
	850	1.38	
	1064	1.37	
	1310	1.36	
	1557	1.36	
Кожа свиньи	1300	1.415	[130]
Дерма свиньи	325	1.393	[131]
	442	1.376	
	532	1.359	
	633	1.354	
	850	1.364	
	1064	1.360	
	1310	1.357	
	1557	1.361	

## 1.2 Оптическое просветление кожи

В настоящее время, научным сообществом было принято три основных механизма ОП биологических тканей, в том числе и кожи [132]. Первый механизм заключается в уравнивании разницы между значениями показателей преломления различных компонент биологических тканей, а также тканевых жидкостей за счет проникновения ОПА внутрь ткани [34, 35, 40–42, 101, 132–135]. Вторым механизмом ОП является дегидратация биологических тканей, вызванная за счет гиперосмолярных свойств ОПА [34, 36, 41, 133, 136–138]. Третий механизм ОП связан с процессом обратимой диссоциации коллагеновых волокон в дерме при взаимодействии кожи с ОПА [41, 139–142]. Данный процесс также способствует дестабилизации коллагеновой структуры путем взаимодействия водородных связей коллагена и ОПА, что в итоге выражается в значительном уменьшении светорассеяния коллагеновых структур в связи с уменьшением размера рассеивающих частиц [137, 143]. Важно учитывать, что описанные механизмы ОП обычно реализуются не независимо друг от друга, а происходят совместно. Кроме того, относительный вклад каждой из этих компонент на ОП как правило является неравнозначным и зависит от множества факторов и параметров (например, тип биологической ткани, концентрация ОПА, его молекулярный состав, время воздействия ОПА на биологическую ткань и т.д.). В ряде публикаций было выдвинуто предположение о том, что применение ОПА вызывает дегидратацию тканей, что в свою очередь приводит к уменьшению рассеяния в мягких тканях за счет вытеснения воды из областей между коллагеновыми волокнами. Таким образом в результате описанного процесса уменьшается разница между значениями показателей преломления различных компонент биологической ткани [34, 43, 144, 145]. Например, показатель преломления эпидермиса человека для длины волны 590 нм равен 1.44, а дермы 1.39. Показатель преломления воды равен 1.33 для той же длины волны. В тоже время, для 70% раствора глицерина и 100% Омнипак значение

показателя преломления равно 1.43, что значительно ближе к значениям компонент человеческой кожи [128, 146]. В ряде публикаций была показана возможность значительного уменьшения коэффициента рассеяния за счет воздействия ОПА на ткани [35, 100, 145, 147–149]. Помимо этого, дегидратация ткани также приводила к структурным изменениям, в частности к сжатию биологической ткани, что в свою очередь также способствует увеличению ее прозрачности за счет интерференционных явлений при рассеянии света на упорядоченных структурах.

Таким образом, эффективность ОП биологических тканей зависит от большого числа факторов, таких как показатель преломления ОПА, его концентрация (что также влияет на показатель преломления), осмолярность и т.д. Также важны и параметры биологической ткани, такие как, ее изначальная мутность, а также ее проницаемость для молекул данного ОПА. Помимо этого, стоит принимать во внимание тот факт, что для *in vivo* исследований, эффективность ОП также может зависеть от таких физиологических особенностей ткани как ее метаболическая реакция на ОПА, температура и особенности функционирования (степень кровоснабжения, наличие развитой лимфатической системы) [34, 36, 101, 132, 137, 148, 150–153]. Кроме того, показатели преломления живой ткани зависят от ее физиологического и патологического состояния. В частности, стоит учитывать, что инъекции глицерина и глюкозы непосредственно в кожу влияют на состояние микроциркуляции крови в дерме. Более того, величина данного влияния зависит от концентрации и продолжительности воздействия ОПА [49, 154, 155]. Таким образом, подбор ОПА с оптимальными параметрами, а также подбор оптимальных экспериментальных условий является сложной и важной задачей, решение которой позволит неинвазивно и более эффективно исследовать глубокие слои биологических тканей.

С момента начала использования метода ОП различные вещества и их комбинации активно исследовались на предмет возможности их использования в

качестве ОПА. Был установлен ряд веществ показавших крайне высокую эффективность в качестве агентов для визуализации биологических тканей. На данный момент, все известные ОПА для иммерсионного применения можно условно разделить на следующие группы:

- 1) Многоатомные спирты: глицерин, полиэтилен гликоль (ПЭГ), полипропилен гликоль, а также растворы на основе сорбитола, полипропилен гликоля, полиэтилен гликоля, ксилита и маннита [43, 138, 147–150, 154–163];
- 2) Сахара: глюкоза, фруктоза, рибоза, сахароза и декстроза [100, 155, 164–166];
- 3) Органические кислоты: олеиновая и линолевая кислоты [50, 167];
- 4) Прочие органические растворители: ДМСО, тиазон [38, 41, 50, 167–174].
- 5) Рентгеновские контрастные агенты: Верографин™, Тразограф™, Гипокью™, и Омнипак™ [45, 47, 48].

На данный момент, наиболее популярными и широко используемыми ОПА, особенно при просветлении кожного покрова, являются глицерин, глюкоза и ПЭГ в силу их отличной биосовместимости и фармакинетики относительно биологических тканей [42, 44, 133, 171, 175–177]. Обычно данные ОПА рассматриваются как нетоксичные. Тем не менее, в ряде работ было показано, что долгое их воздействие на живые ткани может вызывать ряд негативных эффектов, таких как локальный гемостаз и чрезмерное сжатие тканей, а в некоторых случаях даже некроз при инъекции в кожу. В частности, в работах [141, 142] было показано, что диссоциация коллагеновых волокон вызванная воздействиям глицерина может привести к изменениям морфологии дермы кожи и сухожилий у грызунов. Более того, глицерин оказывает влияние на кровеносные сосуды кожи. Например, было показано, что он вызывает венозный и артериальный застой [178]. В работах [154, 155] было показано, что применение таких ОПА как глюкоза и глицерин может провоцировать полную остановку кровотока в поверхностных сосудах. Также, в ряде исследований

было отмечено, что некоторые ОПА способны вызывать отечность и раздражение тканей [100, 138, 148, 152, 153].

Таким образом, одной из принципиальных задач для безопасной *in vivo* визуализации живых тканей является поиск оптимального ОПА, его концентрации и времени применения. Относительно исследований кожного покрова, наиболее приоритетными являются те ОПА, которые позволяют избежать деформации слоев кожи, а также вызывают минимальную дегидратацию.

Как было сказано выше, эффективность ОП зависит от множества факторов. Важнейшими из этих факторов являются тип ОПА, его концентрация, а также время, в течение которого биологическая ткань подвергается обработке используемым просветляющим агентом. В некоторых случаях, например, просветление ткани до полной прозрачности может занимать несколько недель [135]. Барьерная функция рогового слоя кожи в значительной степени препятствует проникновению ОПА (особенно ОПА с высокими концентрациями) в глубокие слои дермы. Таким образом, ОП кожи занимает гораздо большее время по сравнению с другими мягкими типами биологических тканей. Низкие концентрации ОПА, как правило, не могут обеспечить достаточно эффективного ОПА. В тоже время, длительное воздействие высококонцентрированными ОПА может вызвать негативное воздействие на кожный покров. Для решения данной проблемы, были введены методы позволяющие ускорить процесс ОП. Например, ДМСО, линолевые и олеиновые кислоты, этанол и пропилен гликоль широко используются в качестве химических усилителей проникающей способности для ОПА [38, 41, 132, 165, 168, 169, 172–174, 177, 179–186]. Более того, ДМСО, пропилен гликоль и олеиновая кислота часто используются отдельно в качестве вполне эффективных ОПА [38, 41, 50, 157, 187–190]. Предварительная обработка кожи этанолом позволяет модифицировать свойства кожного барьера рогового слоя, а также ускорить проникновение ОПА через придатки кожи и непосредственно через эпидермис [161,

185]. Более того, этанол обезжиривает поверхность кожи, что также в значительной степени ускоряет проникновение ОПА в дерму.

Кроме того, в дополнение к применению химических усилителей проникновения ОПА, биологические ткани, в том числе и кожу, зачастую подвергают предварительной физической обработке. Например, среди физических методов усиления проникновения ОПА в кожный покров наиболее популярными являются такие методы, как удаление поверхностной части рогового слоя с помощью клейкой ленты [191], лазерное облучение поверхности кожи [192, 193], электрофорез [193], микро-травмирование эпидермиса [194], микродермабразия [195], фототермическая и механическая перфорация [196], ультразвук [197] и т.д.

### **1.3. Исследование оптического просветления кожи методами двух-фотонной и многофотонной томографии**

Эффект двух-фотонного возбуждения был описан Марией Гёпперт-Майер в 1931 году [198]. Данный эффект удалось экспериментально пронаблюдать гораздо позднее, только после изобретения лазера [199]. Стандартное одно-фотонное возбуждение может быть описано следующим образом. Флуорофор находящийся в основном состоянии ( $S_0$ ) может поглотить одиночный фотон, который провоцирует возбуждение флуорофора на более высоком энергетическом уровне ( $S_1$ ). После нахождения в возбужденном состоянии в течении некоторого времени флуорофор возвращается в основное состояние, при этом излучая фотон света. Для реализации данного процесса должно быть соблюдено следующее условие:

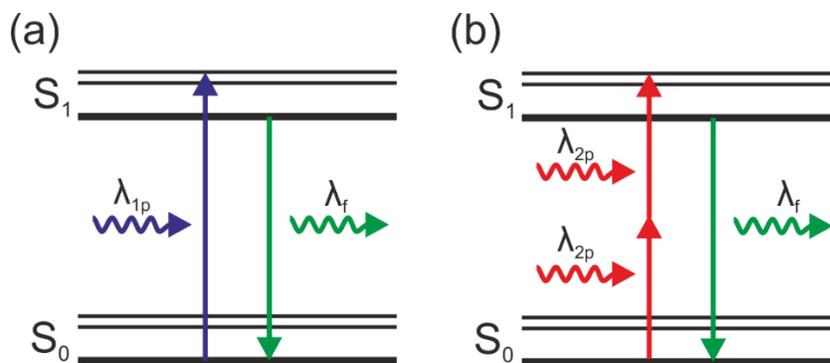
$$E_{s1} - E_{s0} = \frac{hc}{\lambda_{1p}}, \quad (1)$$

где  $E_{s1}$  – энергия флуорофора в возбужденном состоянии,  $E_{s0}$  – энергия флуорофора в основном состоянии,  $h$  – постоянная Планка,  $c$  – скорость света в вакууме,  $\lambda_{1p}$  – длина волны возбуждающего фотона при одно-фотонном возбуждении.

В отличие же от одно-фотонного возбуждения, двух-фотонное возбуждение возникает вследствие одновременного поглощения двух фотонов. В данном случае каждый из фотонов имеет энергию в два раза меньшую энергии соответствующей одно-фотонному поглощению. Поскольку энергия фотона обратно-пропорциональна его длине волны, то при двух-фотонном возбуждении фотоны должны иметь длину волны ( $\lambda_{2p}$ ) приблизительно в два раза большую, чем при одно-фотонном возбуждении:

$$E_{s1} - E_{s0} = 2 \frac{hc}{\lambda_{2p}}, \quad (2)$$

На рисунке 1 приведены диаграммы для процессов одно- и двух-фотонного возбуждения флуоресценции.



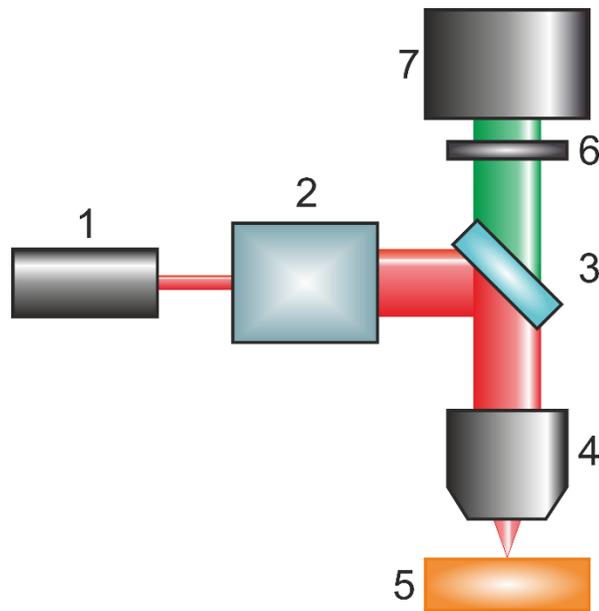
**Рисунок 1.** Диаграмма изображающая принцип (а) одно-фотонного возбуждения и (б) двух-фотонного возбуждения.  $S_0$  – основное состояние флуорофора;  $S_1$  – возбужденное состояние флуорофора;  $\lambda_{1p}$  – длина волны возбуждающего фотона при одно-фотонном возбуждении;  $\lambda_{2p}$  – длина волны возбуждающего фотона при двух-фотонном возбуждении;  $\lambda_f$  – длина волны флуоресценции.

Для успешного возбуждения двух-фотонной флуоресценции необходимо, чтобы оба фотона поглотились одновременно (интервал между событиями не должен превышать  $10^{-18}$  секунд). Таким образом, для увеличения вероятности данного события поток фотонов должен быть гораздо большим чем для одно-

фотонного возбуждения флуоресценции, что может быть достигнуто использованием высокомоощного лазерного источника. Тем не менее, для увеличения плотности фотонов, на практике используется импульсный фемтосекундный лазер плотно сфокусированный на объект [200]. В частности для визуализации биологических объектов [201], используется импульсный фемтосекундный источник с длиной волны на 760 нм возбуждающий флуоресценцию в ультрафиолетовом диапазоне на длине волны 380 нм. Биологические ткани имеют крайне высокую проницаемость для данной длины волны, что обеспечивает возможность визуализации глубоких слоев кожи (до глубин  $\approx 200$  мкм).

Ближайшим аналогом МФТ является конфокальная микроскопия. Тем не менее, поскольку источник возбуждения генерирует флуоресценцию по всему образцу, сигнал конфокальной микроскопии может быть получен только в фокальной плоскости системы. Также, поглощение возбуждающего излучения приводит к эффекту фотоблиинга и фотоповреждения, что является крайне критичным при *in vivo* изучении биологических объектов. Кроме того, глубина детектирования конфокальной микроскопии значительно ограничена сильным рассеянием биологическими образцами возбуждающих и излучаемых фотонов, а также поглощением возбуждающей энергии.

МФТ является эффективной альтернативой для конфокальной микроскопии, поскольку данный метод не страдает от эффектов фотоблиинга и фототоксичности, что делает МФТ более безопасным для исследований живых объектов. Также, за счет меньшего влияния рассеяния исследуемых образцов, данный метод обладает большей глубиной зондирования.



**Рисунок 2.** Оптическая схема МФТ. 1- фемтосекундный импульсный источник; 2 – сканирующий модуль; 3 – дихроичное зеркало ; 4 – фокусирующий объектив ; 5 – исследуемый образец ; 6 фильтр для детектирования сигналов АФ и ГВГ ; 7 – фотоумножитель.

Коммерчески доступные МФТ системы используют фотоумножители для детектирования сигнала автофлуоресценции (далее кратко автофлуоресценция (АФ)). Помимо этого, МФТ системы позволяют детектировать сигнал генерации второй гармоники (ГВГ). В отличие от АФ, для которой фотоны поглощаются исследуемым объектом вызывая флуоресцентное излучение (с некоторой потерей энергии), при возникновении сигнала ГВГ исследуемый образец не поглощает фотоны (без потери энергии). Детектирование сигналов АФ и ГВГ осуществляется с помощью эмиссионных фильтров расположенных перед фотоумножителем. На рисунке 2 приведена схема МФТ системы. В случае исследования кожи, сигнал АФ формируется за счет NAD(P)H, эластина, меланина и в меньшей степени кератина. В свою очередь, сигнал ГВГ формируется за счет отклика молекул коллагена I типа. Тем не менее, несмотря на все достоинства МФТ для исследования биологических объектов, глубина зондирования данного метода при исследовании кожного покрова

ограничена за счет сильного рассеяния [202]. Таким образом, применение ОПА при изучении кожи методом МФТ может быть крайне полезным инструментом, способным в значительной степени увеличить возможности данного нелинейно-оптического метода визуализации.

В работе [142] представлены результаты изучения ОП кожи с помощью МФТ, где авторы предложили молекулярный механизм как один из механизмов ОП. Данное предположение было основано на том, что проникновение чистого (100%) глицерина в дерму и хвостовое сухожилие у грызунов привело к последующей временной и обратимой потере организации фибрилл в этих тканях. Подобного рода изменения в организации коллагеновых структур, а также уменьшение их диаметра способствует снижению рассеяния в биологических тканях.

В работе [44] впервые была исследована возможность увеличения глубины визуализации кожи с помощью двухфотонной томографии (ДФТ) путем применения ОПА. В данной работе, дерма кожи человека была исследована при воздействии таких гиперосмотических агентов, как глюкоза, глицерин и полипропилен гликоль. В результате проведенных исследований самым эффективным, но в тоже время и самым медленным ОПА, оказался глицерин (относительный контраст для него составил 16.3 на глубине 20 мкм). Близким по эффекту к глицерину оказался раствор пропилен гликоля (относительный контраст для него составил 12.6 на глубине 20 мкм). Наименее эффективным агентом оказалась глюкоза, для которой относительный контраст на глубине 20 мкм составил 5.1. Тем не менее, процесс ОП для глюкозы был в три раза быстрее, чем для глицерина.

В работе [202] было показано, что одновременное комбинирование конфокальной томографии и ДФТ с последующей 3-D визуализацией может быть эффективно использовано для неинвазивного исследования коллагеновых структур. В качестве ОПА авторы использовали смесь из ДМСО, диатризоатной кислоты и глюкамина. Данная смесь широко известна под названием FocusClear [203]. Более

того, в работе [202] было показано, что FocusClear обеспечивает в значительной степени лучшее пропускание на длинах волн 488, 543 и 633 нм, чем чистый ДМСО и глицерин. Флуоресцентное излучение на длине волны 505 нм также было более интенсивным при использовании FocusClear.

Комбинированное использование флуоресцентной микроскопии и двухфотонной томографии позволило присвоить уникальные морфологические и спектроскопические характеристики различным компонентам кожи человека [204]. Более того, полученные данные позволяют различить больные участки кожи (например ткани с меланомой и базально-клеточной карциномой) от здоровой кожи.

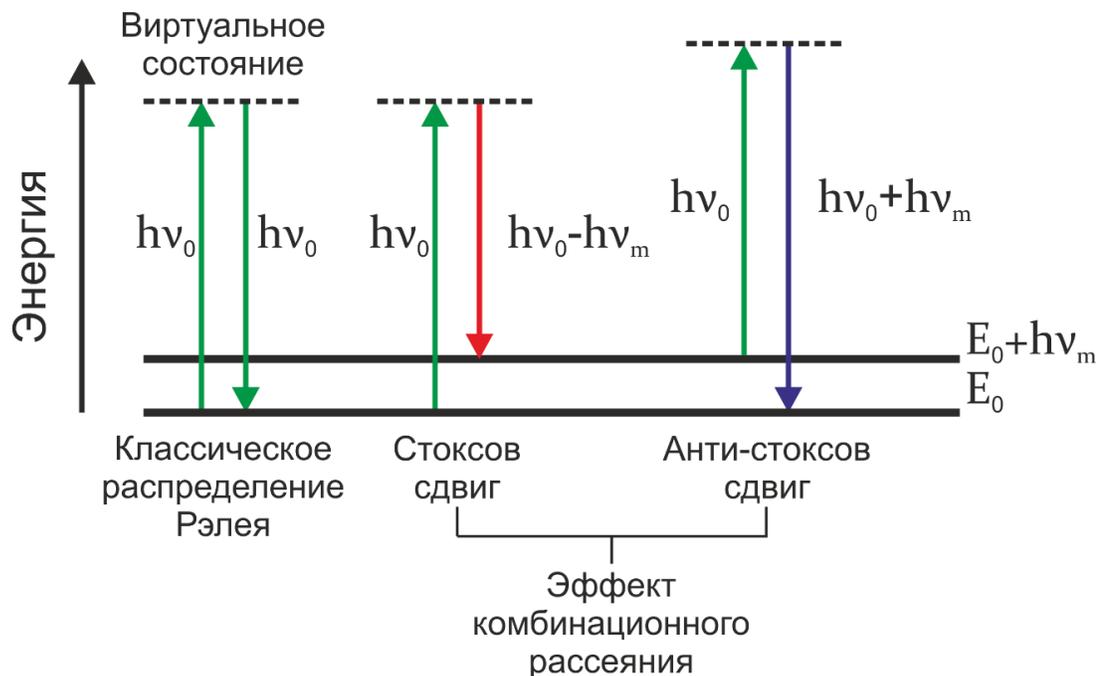
В работе [205] было показано, что применение МФТ позволяет разделить по времени различные процессы, происходящие при воздействии ОПА на ткани с высоким содержанием коллагеновых структур. Было установлено, что первый процесс – это быстрая дегидратация ткани и сопутствующее ей сжатие коллагеновых структур. Второй процесс – это процесс сравнительно медленного проникновения ОПА в межфибрилярное пространство коллагена. Также было показано, что применение растворов глицерина с низкими концентрациями вызывает значительно меньший эффект ОП. Авторы выдвинули предположение о том, что данный эффект связан с тем фактом, молекулы ОПА частично заменяют молекулы воды в тканях. Таким образом, более высокая концентрация глицерина приводит к большей замене молекул воды на молекулы ОПА, что проявляется в более эффективном ОП. Кроме того, в работе было показано, что эффекты, вызванные применением чистого (100%) глицерина и фосфатного буферного раствора смешанного с глицерином в равных пропорциях (50%/50%) являются обратимыми при применении данных ОПА в течении нескольких минут.

В работе [138] было показано, что *in vivo* воздействие глицерина на кожу крысы в качестве ОПА приводит к снижению диффузного отражения кожи. Более того, 30-ти минутное воздействие на кожу 75% раствором глицерина позволило

просветлить ее до состояния прозрачности. Данному процессу сопутствовало уменьшение толщины дермы с 1459 мкм до 1287, а также уменьшение диаметра коллагеновых волокон с 109 нм до 79 нм, что может быть объяснено сильным вытеснением воды из ткани, вызванным применением глицерина. Несмотря на такое значительное сжатие, коллагеновые волокна не растворялись и не обрывались в ходе эксперимента. Данный факт позволил авторам предположить, что один из важнейших механизмов ОП связан с изменением толщины (а конкретно со сжатием) слоя ткани и сопутствующей более плотной и упорядоченной упаковкой волокон, а также уменьшением диаметра волокон за счет дегидратации межфибриллярного вещества и самих коллагеновых волокон.

Уменьшение рассеяния за счет применения ОПА эффективно помогает выходу флуоресценции до тех пор, пока фронт просветления не достигнет излучаемых флуорофоров. Но поскольку в отсутствии рассеяния полная длина пути фотона, возбуждающего флуоресценцию, значительно уменьшается, то, в свою очередь, снижается и вероятность встретить флуорофор и вызвать его возбуждение. Тем не менее, в случае его возбуждения, он с большой вероятностью дойдет до детектора в следствии малого рассеяния. Таким образом, следует иметь в виду, что чрезмерно сильное ОП может привести к значительной потере сигнала [206].

#### 1.4. Исследование оптического просветления кожи методом спектроскопии комбинационного рассеяния

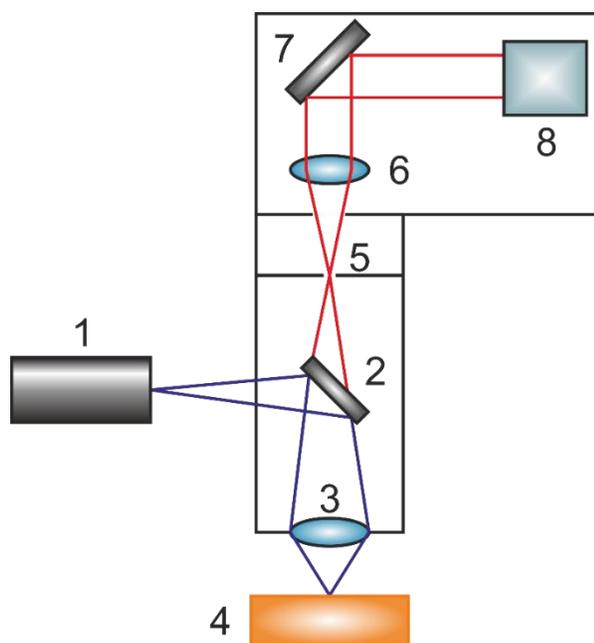


**Рисунок 3.** Диаграмма Яблонского с демонстрацией процессов изменения энергетического состояния при распределениях Рэля и эффекте комбинационного рассеяния.

Эффект комбинационного рассеяния (КР) был открыт в 1928 году Раманом [207]. Наиболее удобно данный эффект описать с точки зрения квантовой теории. Таким образом можно рассматривать свет в виде фотонов, которые рассеиваются при взаимодействии с молекулами материи. Количество молекул рассеянных вследствие взаимодействия пропорциональны размеру связей в молекулах [208, 209]. В основе спектроскопии КР (далее СКР) лежит детектирование неэластичного рассеянного света при обмене колебательной и вращательной энергий между зондирующим излучением и молекулами облучаемой ткани. На рисунке 3 представлена диаграмма Яблонского на которой можно увидеть возбуждение молекулы фотоном и последующий ее переход в виртуальное состояние.

При этом потенциально возможны три события. Первое: молекула может вернуться из виртуального состояния обратно в основное, при этом испустив фотон с энергией  $h\nu_0$ , которая равна энергии возбуждающего фотона. Данный процесс является эластичным. Он получил название распределения Рэля. Второе: молекула может перейти в фотонное состояние, при этом испустив фотон с энергией  $h\nu_0 - h\nu_m$ , которая меньше энергии возбуждающего фотона. Данный процесс получил название стоксовый сдвиг распределения комбинационного рассеяния. Третье: молекула, находящаяся в фоновом состоянии, возбуждается и переходит в виртуальное состояние. После этого она возвращается в основное состояние, при этом испуская фотон с энергией  $h\nu_0 + h\nu_m$ , которая больше энергии возбуждающего фотона. Данный процесс получил название анти-стоксовый сдвиг распределения комбинационного рассеяния. Поскольку вероятность последнего процесса крайне мала, по причине того что при комнатной температуре большинство молекул исследуемой материи находятся в основном состоянии, большинство измерений в СКР выполняются при стоксовом сдвиге.

На рисунке 4 приведена стандартная оптическая схема для спектроскопа КР. Поскольку измерения в СКР основаны на детектировании изменений в длинах волн, для реализации оптической установки необходим монохроматический источник излучения с чрезвычайно стабильной рабочей частотой. Также, дополнительно устанавливается узкополосный фильтр для того, чтобы создать узкую полосу возбуждающего излучения. Для успешных измерений на биологических образцах как правило используются источники возбуждения в инфракрасном диапазоне длин волн (обычно 785 нм), поскольку для более коротких длин волн большой вклад в получаемый сигнал начинает оказывать флуоресценция. Сигнал КР от исследуемого образца может содержать линии расположенные близко к друг другу. Таким образом, для анализа сигнала поступающего на ПЗС-матрицу, необходимо использовать спектрометры с высоким разрешением.



**Рисунок 4.** Оптическая схема системы СКР. 1 - источник лазерного излучения; 2 – узкополосный фильтр; 3 - фокусирующая линза; 4 - исследуемый объект; 5 – апертура; 6 – коллимирующая линза; 7 – дифракционная решетка; 8 – ПЗС-матрица.

Спектр КР биологической ткани представляет из себя его молекулярный отпечаток, который содержит информацию о ее химическом составе. Таким образом, даже самые незначительные изменения в клетках и тканях могут приводить к сильным изменениям в спектре КР. Данная особенность позволяет использовать СКР в качестве удобного инструмента для измерения химического состава различных типов биологических тканей [210–212]. Таким образом, СКР и микроскопия КР (далее МКР) являются безальтернативными инструментами для исследования биологических тканей, в частности для *in vivo* анализа эпидермиса кожи [213–216]. Помимо этого, СКР активно используется для мониторинга проникновения ксенобиотиков в кожу [71, 217, 218]. Для простоты предоставления и сравнения результатов исследований учеными было принято использовать спектральную область между 400 и 2000  $\text{см}^{-1}$  при возбуждении на 785 нм. Колебания молекул исследуемой ткани приводят к возникновению сигнала КР в данной

области волновых чисел. В большинстве случаев, линии КР соответствует конкретным типам молекул и их молекулярным колебаниям, что позволяет с достаточно высокой точностью получить информацию о биохимическом составе исследуемой биологической ткани [219, 220]. Тем не менее, как и в случае с МФТ, из-за сильного рассеяния света кожей, описанный метод имеет строгое ограничение для *in vivo* измерений. Как правило, глубина зондирования ограничена толщиной эпидермиса, т.е. глубиной  $\approx 40-50$  мкм. Поскольку ОП позволяет уменьшить упругое рассеяние света и достичь более эффективного взаимодействия зондирующего лазерного пучка с исследуемым тканями, применение ОП при использовании СКР позволяет в значительной степени улучшить качество клинических измерений.

Многие ОПА имеют свой собственный уникальный спектр КР. Таким образом использование СКР при исследовании процесса ОП позволяет осуществлять мониторинг проникновения и распределения ОПА в тканях. В работе [182] были показаны результаты изучения проникновения ДМСО в кожу человека. В ходе исследований было установлено, что основная часть ОПА проникала через роговой слой кожи в течении 20 мин.

В работе [219] было показано, что применение ОПА в значительной степени позволяет увеличить отношение сигнал/шум, усилить сигнал КР, а также уменьшить систематическую ошибку, которая может возникнуть из-за неточного определения поверхностных и суб-поверхностных спектров изучаемого образца.

Авторами работы [221] была показана возможность мульти-модального использования МФТ (в частности используя сигнал ГВГ) и КАСКР (когерентная антистоксова спектроскопия КР) для изучения эффекта ОП на кожу человека. В качестве ОП использовался ДМСО. На основании полученных результатов, авторы выдвинули предположение о том, что ДМСО взаимодействует с коллагеновыми волокнами, что проявляется в изменении межфибриллярного расстояния в субмикронном масштабе. Также, было показано, что применение 20% водного

раствора ДМСО никак не повлияло на рассеяние кожи, в то время как 40 % раствор ДМСО приводил к уменьшению рассеяния кожи. Таким образом, данная работа подтвердила теорию о том, что механизмы согласования показателей преломления компонент тканей и изменения в структуре коллагеновых волокон играют важную роль в процессе ОП. Также, в данной работе было показано, что концентрация ДМСО меняется со временем на различных глубинах в коже, что делает возможным определение коэффициента диффузии ДМСО. Максимальная концентрация 40% раствора ДМСО уменьшилась до значения 10% на глубине 25 мкм (что соответствует эпидермису) в течении 3 часов. Данное снижение концентрации также сопровождалось дегидратацией кожного покрова и уменьшением барьерной функции рогового слоя.

В работе [222] было показано, что местное применение водного раствора глицерина на свиную кожу позволяет в значительной степени увеличить глубину детектирования спектров КР. Также были изучены эффекты ОП вызванные применением 40%, 60% и 80% растворов глицерина, вследствие чего было установлено, что увеличение концентрации данного ОПА привело к увеличению эффективности ОП.

В работе [223] было показано, что спектр КР свиной кожи зависит от содержания в ней воды. Было продемонстрировано, что для кожи с 40%, 45%, 50% и 55% содержанием воды соотношение линий протеина на  $1450\text{ см}^{-1}$  и  $1660\text{ см}^{-1}$  существенно разнится. Данные экспериментальные результаты также были подтверждены с помощью моделирования методом Монте-Карло. Увеличение содержания воды в коже приводит к распределению обратного рассеяния в большей угловой области. В связи с этим, авторы предположили, что для точного диагностирования кожных заболеваний методом КР нужно контролировать содержание воды во время измерений. В работе [224] приведен подробный сравнительный анализ распределения концентрации воды в роговом слое в

зависимости от силы водородных связей для кожи человека *in vivo* и свиной кожи *ex vivo*.

Сигнал КР в значительной степени зависит от наличия упругого рассеяния [225, 226]. Таким образом, необходимо учитывать тот факт, что применение ОПА с высокими концентрациями может настолько снизить рассеяние, что это в свою очередь приведет к потере сигнала КР. В связи с этим, при измерениях с использованием ОП необходимо искать компромисс между потерей сигнала КР при отсутствии рассеяния кожи и усилением сигнала КР при сильном рассеянии [225, 227]. Из этого следует, что поиск биосовместимых ОПА, оптимизация их концентраций и длительности воздействия является важной задачей для обеспечения эффективного изучения живых тканей на больших глубинах с помощью методов КР.

В работе [228] представлен метод для *in vivo* определения различных типов чернил в татуированной коже после ОП глицерином при использовании микроскопии КР. Применение ОП позволило увеличить глубину детектирования с 50 до 400 мкм.

В связи с тем, что сильное рассеяние кожи и относительная слабая интенсивность КР в значительной степени уменьшают разрешение и контраст спектров КР, активное развитие получили методы на основе гигантского КР (ГКР) [165, 229–232]. Данные методы позволяют значительно увеличить чувствительность и глубину измерений в коже. В работе [233] было показано, что применение ОПА способно дополнительно повысить чувствительность ГКР при измерении на коже мыши. Был протестирован ряд ОПА, среди которых наиболее эффективным проявил себя агент FRT, являющийся смесью фруктозы, ПЭГ-400 и тиазона. Максимальный эффект ОП был зафиксирован через 15 минут после применения данного агента. Его эффективность была в 3,5 раза выше, чем после применения раствора фруктозы.

## Глава 2

# Исследование оптического просветления кожи *ex vivo* с использованием двух-фотонной томографии

Целью исследования данной главы диссертационной работы было *ex vivo* изучение влияния ОП на сигналы АФ и ГВГ свиной кожи при помощи методов МФТ. В частности, было изучено влияние различных концентраций растворов глицерина и Омнипак на улучшение визуализации коллагеновых структур в дерме.

### 2.1 Материалы и методы

#### 2.1.1. Подготовка образцов кожи

В данном исследовании измерения проводились *ex vivo* на образцах свиной кожи взятых с ушной области. Свиная кожа гистологически [234, 235], морфологически [236] и иммуногистохимически [234] сходна с кожей человека. Тем не менее, несмотря на большое количество общих свойств, *ex vivo* роговой слой свиной кожи обладает значительно меньшей барьерной функцией по сравнению с *in vivo* кожей человека, что было показано в работе [224].

Свиные уши поставлялись мясником (Gerald Nusche Rind/Schweineschlachtereі, Кёнигс-Вустерхаузен, Германия) в лабораторию в день забоя, после чего они тщательно промывались холодной водой и обсушивались бумажными полотенцами. Далее, образцы кожи размером 1x1 см<sup>2</sup> и толщиной ≈1.2 мм подготавливались при помощи скальпеля. Готовые образцы кожи хранились в холодильнике при температуре +5°C не более двух дней. Для стандартизации состояния образцов кожи взятых с различных свиной проводились следующие процедуры. Перед

применением ОПА, образцы кожи хранились при комнатной температуре ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) в течении 30-ти минут. Для обеспечения лучшего проникновения ОПА в образцы, с поверхности кожи при помощи бритвы удалялся волосяной покров. Далее, удалялась поверхностная часть рогового слоя с помощью клейкой ленты. Для каждого образца данная процедура повторялось 15 раз. Далее образцы кожи обезжиривались при помощи этанола. В данном эксперименте были исследованы образцы кожи от 6 разных свиней.

### **2.1.2. Оптические просветляющие агенты**

В качестве эталонного ОПА был использован глицерин, поскольку, как уже было сказано выше, он является наиболее изученным и наиболее используемым ОПА для применения на коже. Для экспериментов были выбраны 40%, 60% и 100% водяные растворы глицерина.

Принимая во внимание тот факт, что диффузионные свойства агентов сильно зависят от их температуры, температура раствора сохранялась постоянной на протяжении всех экспериментов ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Для обеспечения лучшего выравнивания между показателями преломления компонент кожи должны использоваться ОПА с большим значением показателя преломления. Использование биосовместимых растворов, изначально разработанных для применения при рентгеновской компьютерной томографии в качестве контрастных агентов, является перспективным подходом для эффективного ОП. Высокий показатель преломления подобных растворов обусловлен содержанием в них молекул йода. Тем не менее, первое поколение рентгеноконтрастных агентов, таких как верографин, тразограф и диатризоат, имели чрезмерно большое содержание ионов. Таким образом, длительное топическое или внутритканевое применение подобных высококонцентрированных агентов приводило к повреждению тканей за счет сильной гиперосмолярности [36]. Для

решения данной проблемы были разработаны неионизированные контрастные агенты. Одним из них является Омнипак™ (торговая марка GE Healthcare) [237] на основе йогексола. Омнипак одобрен к пероральному введению, введению в полые органы человека, а также, в некоторых случаях, к прямой инъекции вещества в исследуемую область. Введенный йогексол всасывается в окружающие ткани и выводится почками и кишечником. Молекулярная масса Омнипак составляет 821.14 (содержание йода 46.36%). Данный неионогенный водорастворимый рентгенографический контрастный агент зарекомендовал себя как крайне перспективный ОПА для различных биологических тканей и крови [43, 238]. Более того, поскольку изначально Омнипак был разработан для рентгенографии, его применение также открывает дальнейшую перспективу мульти-модальной визуализации комбинирующей методы оптической и микро-рентгеновской визуализаций. Таким образом, Омнипак был выбран в качестве исследуемого ОПА в данном эксперименте. Для *ex vivo* исследования ОП свиной кожи с использованием ДФТ были выбраны 100% и 60% растворы Омнипак (йогексол 300 мг/мл) (GE Healthcare Ireland, Ирландия). В таблице 3 приведены значения показателя преломления, осмолярности и вязкости для растворов глицерина и Омнипак. Показатели преломления для глицерина и Омнипак были измерены при помощи рефрактометра Аббе (DR-M2/1550, АТАГО, Япония) на длине волны  $\lambda=760$  нм. Значения осмолярности и вязкости для растворов глицерина и Омнипак были взяты из следующего источника [237, 243].

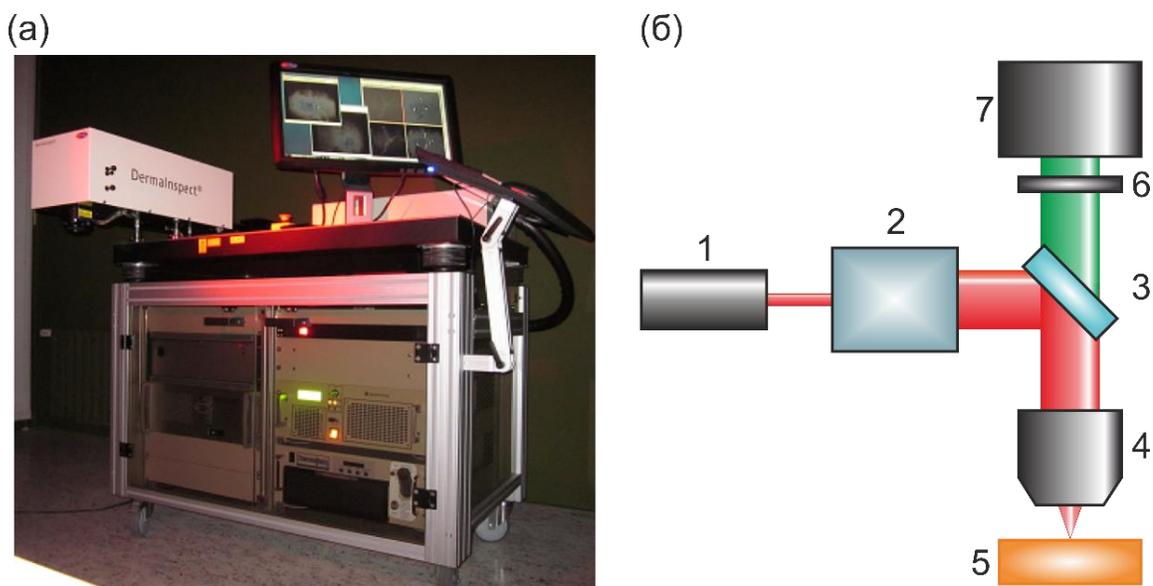
Таблица 3. Показатель преломления, осмолярность и вязкость для растворов глицерина и Омнипак (300) с различными концентрациями.

ОПА	Глицерин			Омнипак (300)	
	40	60	100	60	100
Концентрация, %	40	60	100	60	100
Показатель преломления, n	1.384	1.413	1.474	1.392	1.432
Осмолярность, Осм/л	5.46	8.20	10.87	0.331	0.465
Вязкость, сР	3.7	10.8	1410	3.1	11.8

### 2.1.3. Экспериментальная установка

Исследования проводились при помощи коммерчески доступного ДФТ (DermaInspect, Jenlab GmbH, Германия). На рисунке 5 показана фотография данного прибора и его оптическая схема. В качестве источника лазерного излучения использовался перестраиваемый фемтосекундный титан-сапфировый лазер (Mai Tai XF, Spectra Physics, США, 710–920 нм, 100-фс импульсы с частотой повторения 80 МГц). Для формирования изображений использовался объектив с 40× увеличением и числовой апертурой = 1.3. Данная система позволяет проводить измерения на коже с пространственным разрешением  $0.5 \pm 0.1$  мкм [31]. Для лучшего проникновения в кожу был выбран лазерный источник с длиной волны 760 нм. Для данной длины волны кожа имеет достаточно низкие параметры поглощения и рассеяния. Для визуализации структуры кожи с помощью сигналов АФ и ГВГ были одновременно использованы фотоумножители для областей 410-600 нм и 375-385 нм, соответственно [239]. Максимальный размер каждого полученного изображения составлял  $230 \times 230$  мкм<sup>2</sup>.

Также, описанная система позволяет контролировать мощность лазерного излучения. Таким образом, для того чтобы избежать переэкспонирования верхних слоев кожи, для поверхности кожи мощность выставлялась равной 10 мВт. Далее, мощность постепенно увеличивалась для более глубоких слоев кожи вплоть до значения 50 мВт для дермы. Запись каждого изображения занимала 6 секунд. Данное значение экспонирования было выбрано для того, чтобы избежать возникновения эффекта фотоблинка [241], который может возникать при длительном экспонировании. Описанная система позволяет реализовывать сканирование кожи от рогового слоя до глубин порядка 400 мкм. Тем не менее, на практике, полезная информация от полученных данных может быть извлечена только до глубин порядка 250 мкм.



**Рисунок 5.** (а) Фотография экспериментальной установки [240]. (б)

Оптическая схема МФТ. 1- фемтосекундный импульсный источник; 2 – сканирующий модуль; 3 – дихроичное зеркало ; 4 – фокусирующий объектив ; 5 – исследуемый образец ; 6 фильтр для детектирования сигналов АФ и ГВГ ; 7 – фотоумножитель.

#### 2.1.4. План эксперимента

Для изучения воздействия растворов глицерина и Омнипак на сигналы АФ и ГВГ 6 образцов кожи бралось с каждого свиного уха. 5 образцов на 1 час помещались в чашки Петри с 40%,60%, 100% растворами глицерина и с 60%, 100% растворами Омнипак, соответственно. Таким образом, обе стороны каждого из образцов кожи (дермальная и эпидермальная) подвергались воздействию ОПА. Шестой образец кожи использовался как контрольный, без какого-либо воздействия ОПА. После воздействия на образцы кожи ОПА, для каждого из них записывался набор изображений АФ и ГВГ для глубин от 0 до 350 мкм с шагом 10 мкм. Все параметры, включая зависимость мощности лазерного излучения от глубины, время экспозиции, начальная глубина сканирования и т.д., были одинаковы для измерений на всех образцах. Для лучшей статистической оценки полученных данных, для

каждого из образцов кожи проводилось как минимум три сканирования по глубине на различных участках каждого из образцов.

Изображения АФ канала позволяют получить информацию о структуре эпидермиса, но не подходят для визуализации коллагеновых волокон. В свою очередь, изображения ГВГ канала позволяют получить информацию о структуре дермы и коллагеновых волокон. Таким образом, комбинирование информации полученной при помощи анализа изображений АФ и ГВГ каналов позволяет детально изучить структуру кожи, а также эффекты, оказываемые на нее за счет применения различных ОПА. Полученные изображения были проанализированы при помощи программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health).

## 2.2 Результаты и их обсуждение

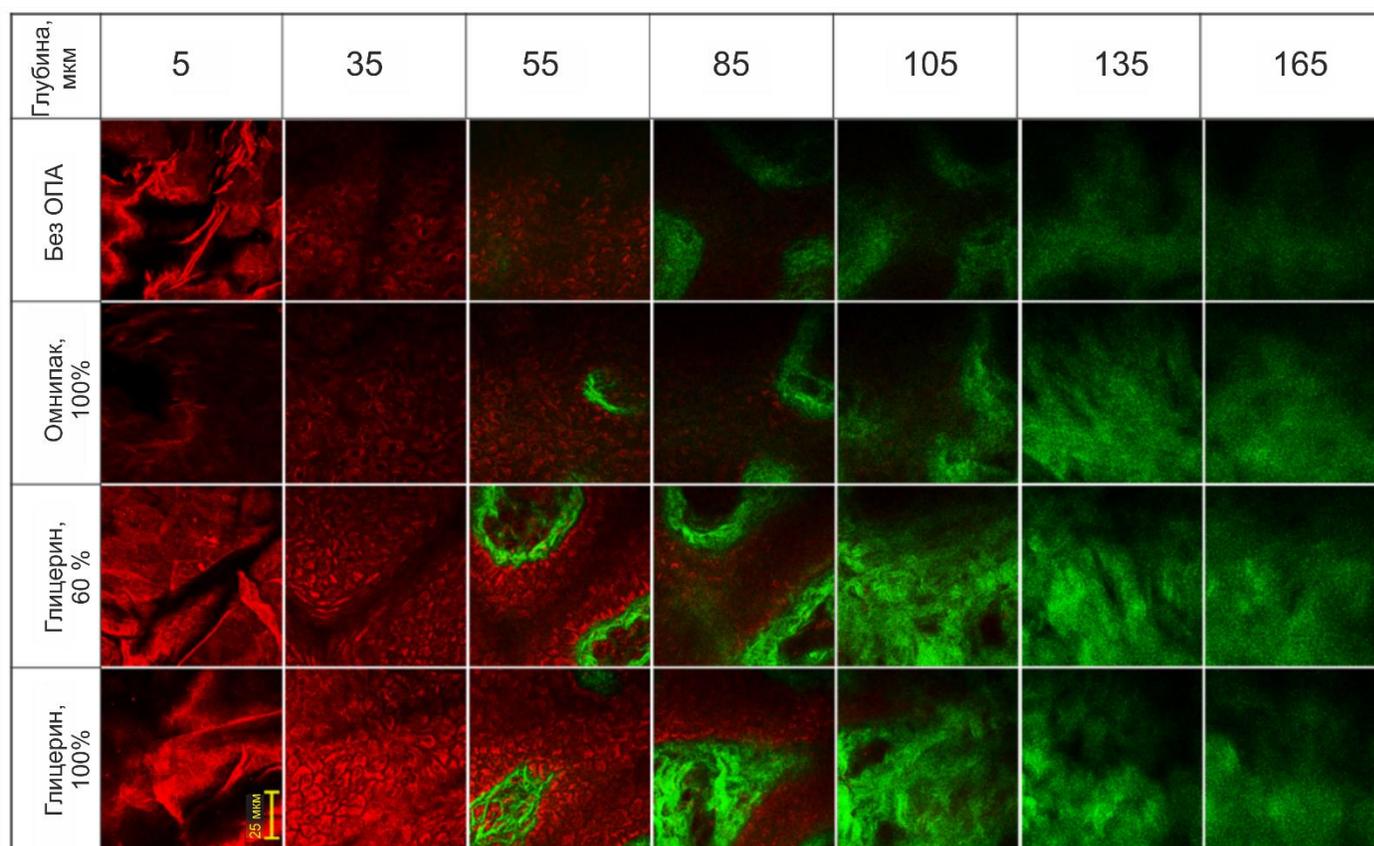
На рисунке 6 представлены примеры изображений структуры кожи полученные для различных глубин при помощи сигналов АФ и ГВГ для одной из серии экспериментов. Каждое изображение соответствует области размером 100x100 мкм. Для лучшей наглядности изображения были окрашены в красный цвет для сигнала АФ и в зеленый цвет для сигнала ГВГ. На рисунке 7 приведены усредненные значения интенсивности сигналов АФ и ГВГ на различных глубинах для всех образцов после применения ОПА, а также для контрольных образцов без воздействия ОПА. Интенсивность обоих сигналов для каждого из экспериментов рассчитывалась по формуле:

$$I = \sum_i^x \sum_j^y I_0(i, j), \quad (3)$$

где  $I$  - значение интенсивности сигнала,  $I_0(i, j)$  – значение интенсивности сигнала в пикселе  $(i, j)$ ,  $x$  – длина полученного изображения в пикселях,  $y$  – ширина полученного изображения в пикселях.

Из рисунка 6 хорошо видно, что сигнал ГВГ значительно усилился после применения растворов обоих ОПА. Более того, применение ОПА сделало

возможным детектирование ГВГ сигнала на меньших глубинах в коже. В частности, для контрольного образца кожи сигнал ГВГ едва различим на глубине 55 мкм. В то же время, применение Омнипак и глицерина позволило отчетливо пронаблюдать присутствие коллагеновых структур на этой же глубине. Также, применение ОПА позволило получить изображение коллагеновых структур в коже с лучшим контрастом. Более того, было улучшено разрешение полученных изображений за счет более точного фокусирования лазерного источника в ткани вызванного уменьшением рассеяния за счет ОП.



**Рисунок 6.** Структурные изображения для различных слоев кожи полученные *ex vivo* для образцов свиной кожи после воздействия растворами Омнипак и глицерина, а также для контрольного образца без применения ОПА. Красный цвет соответствует сигналу АФ. Зеленый цвет соответствует сигналу ГВГ.

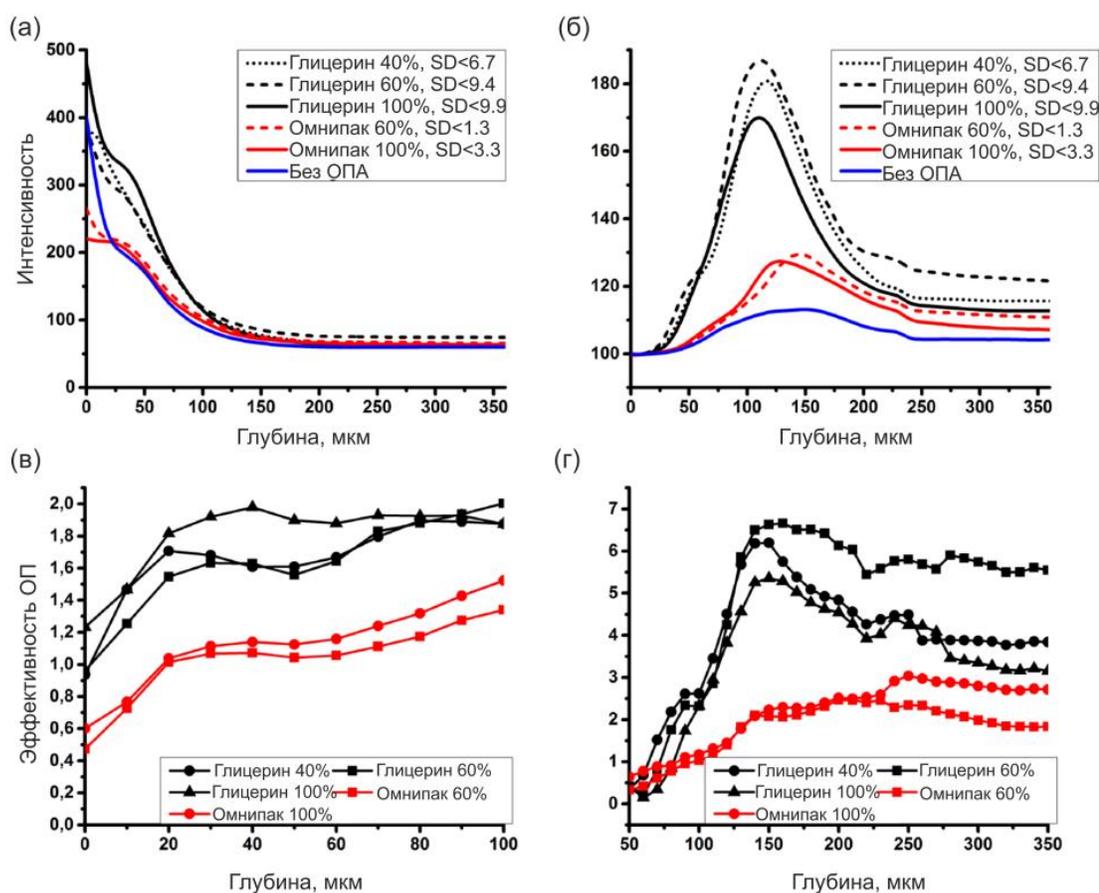
Из рисунка 6 и рисунка 7 отчетливо видно, что воздействие растворами глицерина даже при небольших концентрациях (40%, 60%) в большей степени увеличивает сигнал ГВГ чем Омнипак. Тем не менее, Омнипак может быть перспективным ОПА для клинического применения на коже, поскольку глицерин, при определенных условиях, способен вызывать изменения в морфологии кожи за счет диссоциации коллагеновых волокон, а также сильной дегидратации [40, 242].

100 % глицерин был наиболее эффективен при АФ измерениях на глубинах от 25 до 100 мкм, где интенсивность сигнала увеличилась в 1.6 раза по сравнению с контрольными образцами кожи. Тем не менее, при АФ измерениях на глубинах от 100 до 200 мкм, 60 % раствор глицерина проявил себя более эффективным, увеличив интенсивность АФ в 1.3 раза, в то время как чистый глицерин увеличил интенсивность только в 1.1 раза. На глубине 200 мкм эффект 40% и 100% глицерина был одинаков, но меньше чем для 60% глицерина, который позволил в значительной степени увеличить интенсивность АФ в вплоть до глубины 350 мкм (Рисунок 7а).

Для АФ измерений, воздействие 100% и 60% растворами Омнипак приводило к приблизительно одинаковому увеличению интенсивности АФ на глубинах от 40 до 100 мкм, где интенсивность АФ увеличился в 1.1 и 1.125 раза, соответственно. Также Омнипак в значительной степени увеличил сигнал АФ на глубинах от 100 до 300 мкм (Рисунок 7а).

Важно заметить, что после предварительной обработки поверхности образцов кожи при помощи бритвы, липкой ленты и обезжиривания этанолом, АФ сигнал имел пониженную интенсивность на глубинах от 0 до 20 мкм для всех ОПА (Рисунок 7а). Данный эффект может быть связан с сильным просветлением на этих глубинах, поскольку ОПА взаимодействует с сильно гидрированным «голым» (с частично удалённым роговым слоем) поверхностным слоем кожи [77], и, в свою очередь, уменьшает поглощение кожных флуорофоров [206].

Также следует отметить, что использовавшиеся ОПА не имели заметных флуоресцентных сигналов на длинах волн соответствующих флуоресценции кожных флуорофоров. Спектры флуоресценции образцов кожи после ОП были сходны со спектрами флуоресценции контрольных образцов, за исключением малозначимых изменений в спектре излучения флуорофоров за счет многократного рассеяния при применении ОП [36, 206].



**Рисунок 7.** Усредненные профили интенсивности в зависимости от глубины внутри кожи для сигналов АФ(а) и ГВГ (б) после воздействия на кожу растворами Омнипак и глицерина.  $SD$  – стандартное отклонение для сигналов АФ и ГВГ. Эффективность оптического просветления для сигналов АФ(в) и ГВГ (г) в зависимости от глубины внутри кожи.

Интенсивность сигнал ГВГ измерялась на глубинах от 25 до 350 мкм. Интенсивность ГВГ была увеличена в 1.54, 1.7 и 1.63 раза на глубине от 25 до 200 мкм после применения 100 %, 60 % и 40 % растворов глицерина, соответственно (см. Рисунок 7б). Таким образом, после воздействия ОПА на кожу в течении 1 часа, на глубине от 50 до 200 мкм 100 % глицерин оказался менее эффективным, на чем 60 % раствор глицерина. В то же время, на глубине от 200 до 350 мкм эффект от воздействия чистого глицерина был более менее сравним с эффектом от воздействия 40 % раствора глицерина.

Подобный эффект может быть связан с тем, что чистый глицерин обладает очень большой вязкостью (1410 ср при 20°C) и осмолярностью (10.9 Осм/Л). В то же время, для 40 % и 60 % растворов глицерина вязкость составляет всего лишь 3.7 ср и 10.8 ср, а осмолярность 5.5 Осм/Л и 8.2 Осм/Л (см. Таблицу 3) [243–245]. Таким образом, высокая вязкость чистого глицерина препятствует его быстрому проникновению глубоко в кожу, где с высокой эффективностью генерируется сигнал ГВГ (50 мкм – 200 мкм) (см. Рисунок 7 (б)). Данный процесс может быть описан законом Фика, который гласит, что проницаемость вещества обратно пропорционально зависит от его концентрации. Таким образом, малые концентрации глицерина могут быть недостаточными для того чтобы в значительной степени обеспечить ОП кожи, в то время как более высокие концентрации глицерина не могут проникать на значительную глубину в кожный покров, что также проявляется в снижении эффективности ОП. Данный эффект также был показан в работе [246]. Очевидно, что при выборе просветляющего агента и его концентрации следует принимать во внимание описанный нюанс для достижения оптимального ОП в условиях ограниченного времени воздействия агентом (в данном случае 1 час).

Применение Омнипак вызвало меньшее увеличение интенсивности сигнала ГВГ по сравнению с глицерином. На глубине от 50 до 200 мкм интенсивность была

увеличена в 1.18 и 1.22 раза для 60 % и 100 % растворов Омнипак соответственно (см. Рисунок 7б).

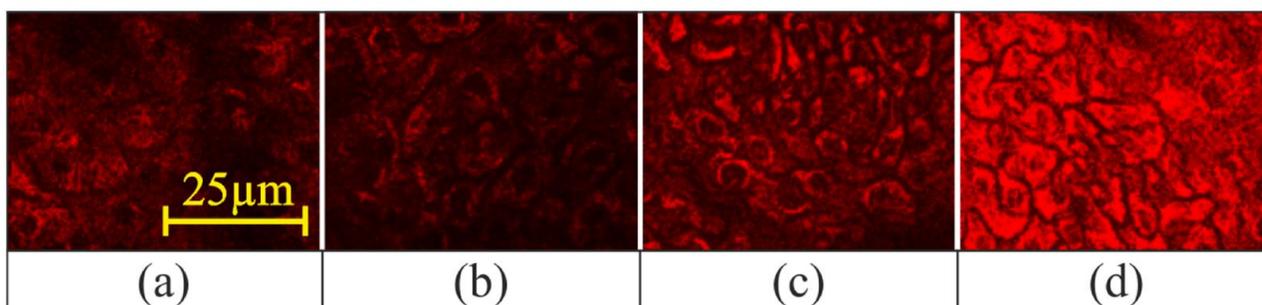
На рисунке 7 также представлены графики зависимости эффективности увеличения сигналов АФ и ГВГ при ОП от глубины в коже рассчитанные как отношение интенсивности сигналов АФ (см. Рисунок 7в) и ГВГ (см. Рисунок 7г) после ОП к значениям интенсивности до ОП. Предварительно проводилась процедура удаления фонового шума. Максимальная эффективность увеличения сигнала АФ при ОП составляла  $1.95 \pm 0.07$  на глубине 100 мкм после применения 60% раствора глицерина и  $1.50 \pm 0.05$  на глубине 100 мкм после применения 100% раствора Омнипак. Максимальная эффективность увеличения сигнала ГВГ при ОП составляла  $6.55 \pm 0.08$  на глубине 150 мкм после применения 60% раствора глицерина и  $3.00 \pm 0.03$  на глубине 250 мкм после применения 100% раствора Омнипак.

Коллагеновые волокна имеют неодинаковое распределение на различных глубинах внутри кожи [44, 176, 205, 247]. В связи с этим, для корректного анализа данных, интенсивности сигнала АФ и ГВГ для контрольных образцов кожи и кожи после применения растворов глицерина и Омнипак сравнивались на одинаковых глубинах. Таким образом, в данном исследовании были построены зависимости сигналов АФ и ГВГ от глубины внутри кожи для контрольных образцов и образцов после воздействия ОПА, которые являются показателем эффективности эффекта ОП.

Высокая осмолярность вызывает сильную дегидратацию тканей [36, 40]. В ходе эксперимента были измерены изменения толщины образцов кожи после применения 100 % глицерина и 100 % Омнипак в течении 1 часа. Средняя толщина контрольных образцов кожи составляла 1.2 мм. Применение чистого глицерина вызвало уменьшение средней толщины кожи до 0.85 мм, в то время как применение чистого Омнипак вызвало уменьшение средней толщины только до 1.05 мм. Данная

разница в степени дегидратации связана с тем, что Омнипак имеет значительно меньшую осмолярность чем глицерин (см. Таблицу 3).

Сжатие кожи за счет дегидратации приводит к изменению механических свойств кожи, а также вызывает деформацию клеток, что может оказывать негативный эффект при клиническом использовании ОПА. Данный эффект можно пронаблюдать на Рисунке 8. Из рисунка видно, что 40 % и 100 % глицерин в значительной степени деформировал структуру клеток эпидермиса (см. Рисунок 8 (в, г)), в то время как 100 % Омнипак вызвал значительно меньшую деформацию (см. Рисунок 8 (б)).



**Рисунок 8.** Сравнение структуры эпидермиса кожи на глубине 35 мкм для контрольного образца кожи (а), и для кожи после применения ОПА (б-г): 100 % Омнипак (б), 40 % глицерин (с) и 100 % глицерин (г).

Важно заметить, что на рисунке 7 (б) максимум интенсивности сигнала ГВГ для контрольных образцов кожи и для кожи после применения растворов Омнипак находится на глубине 140-150 мкм, в то время как для кожи после применения растворов глицерина максимум интенсивности сигнала ГВГ находится на глубине 110-120 мкм. Подобная разница в положении максимумов объясняется различной степенью сжатия кожи в следствии дегидратации для глицерина и Омнипак. Омнипак имеет значительно меньшую вязкость в сравнении с глицерином (см. Таблицу 3), что позволяет ему проникать в кожу и индуцировать процесс ОП быстрее. Более того, Омнипак имеет меньшую осмолярность в сравнение с

глицерином (см. Таблицу 3), что позволяет избежать деформации кожи (см. Рисунок 8 (б)). Таким образом, несмотря на меньшую эффективность ОП в сравнении с глицерином, Омнипак является перспективным ОПА, обеспечивающим значительное ОП кожного покрова в отсутствие заметного воздействия на структуру ткани [248].

Также важно отметить, что в ходе эксперимента, все образцы кожи были погружены в контейнеры с ОПА. Таким образом, обе стороны каждого из образцов (эпидермальный и дермальный) находились в контакте с ОПА. Тем не менее, 1 часа недостаточно для полного проникновения ОПА через весь образец кожи, даже с учетом того, что он полностью погружен в агент [196]. Таким образом, в данном эксперименте не было прямого контакта между ОПА и коллагеновыми структурами на всех исследуемых глубинах. В тоже время, был явно замечен эффект дегидратации связанный с осмотическими свойствами ОПА. Дегидратация воздействует на линейные оптические свойства коллагена за счет снижения коэффициента рассеивания. Подобный эффект может также уменьшить интенсивность сигнала ГВГ. Тем не менее, значительное уменьшение сигнала ГВГ возможно только при прямом контакте высококонцентрированных ОПА с коллагеном или же после многочасового воздействия ОПА [36, 142].

Кожа является сильно рассеивающей, многослойной, гетерогенной тканью. Ее основные компоненты, такие как роговой слой, живой эпидермис и дерма имеют различные оптические и структурные свойства, причем коэффициент рассеяния уменьшается от рогового слоя к дерме, в то время как толщина, наоборот, увеличивается [34, 249]. Поскольку отражение от эпидермиса слабее чем от рогового слоя, в то время как суммарно дерма рассеивает больше света чем роговой слой и эпидермис за счет своей большой толщины, использование оптических методов с высоким разрешением для изучения глубоких слоев кожи является трудной задачей. Применение ОПА на коже приводит к значительному снижению

рассеяния всех слоев кожи за счет таких процессов как выравнивание показателей преломления компонент кожи, временная дегидратация ткани и обратимая диссоциация коллагеновых волокон. Таким образом, уменьшение кратности рассеяния и увеличения коэффициента анизотропии рассеяния [36] приводит к улучшению сигналов АФ и ГВГ полученных из глубоких слоев кожи, что способствует изучению структуры и патологии кожи на более продвинутом и точном уровне.

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами опубликованными в работах [44, 110, 205] с поправкой на то, что в описанном эксперименте время воздействия ОПА на ткань составляла 1 час и обе стороны исследуемых образцов (роговой слой и дерма) находились в контакте с ОПА. Также, недавние *ex vivo* измерения сигнала ГВГ от дермального коллагена человеческой кожи в условиях дегидратации и гидратации показали, что дегидратация способствует значительному усилению сигнала ГВГ, в то время как гидратация, наоборот ухудшает сигнал [250]. Данный результат отлично согласуется с результатами описанными в текущей главе диссертационной работы. В частности, это подтверждает, что сильная дегидратация вызванная применением глицерина является одним из механизмов ОП. Тем не менее, изучение воздействия Омнипак показывают, что другие механизмы ОП также влияют на эффективность ОП.

Полученные в данном эксперименте результаты позволяют предположить, что внедрение ОП для усиления сигналов АФ и ГВГ при *in vivo* измерениях способно значительно улучшить качество дальнейших клинических исследований. Тем не менее, полный механизм ОП все еще является не полностью изученным. Несмотря на то, что глицерин сильнее способствовал увеличению сигналов АФ и ГВГ, он оказывал большее воздействие на структуру клеток кожи. В связи с этим, Омнипак может быть предложен как перспективный ОПА для клинических *in vivo* исследований кожи.

В текущей главе диссертации термин «оптическое просветление» был использован в общем смысле, подразумевая под собой процесс опрозрачивания биологической ткани за счет уменьшения ее коэффициента рассеяния [36]. Таким образом, для много-фотонных измерений, сигналы АФ и ГВГ могут уменьшаться в следствии слишком интенсивного ОП. Как уже было сказано выше, в текущем эксперименте сигнал АФ пропадал после применения ОПА в поверхностных слоях кожи, которые становились практически полностью прозрачными. Кроме того, более длительное и интенсивное ОП способно также привести к полному выравниванию показателя преломления коллагеновых структур, и таким образом, практически полностью уничтожить сигнал ГВГ [36, 142]. Данный фактор нужно учитывать при использовании методики ОП и подбирать ОПА, их концентрации и условия применения таким образом, чтобы получать оптимальные сигналы АФ и ГВГ на интересующих глубинах внутри ткани. Рисунок 7 хорошо иллюстрирует данное заключение.

Дальнейшее комбинирования МФТ с другими оптическими методами, такими как ОКТ и СКР позволит повысить качество изучения кожного покрова. Также, дополнительно повысить эффективность данных мульти-модальных техник позволит иммерсионное применение ОПА [34, 36, 42, 133, 137, 177, 251, 252]. Кроме этого, ожидается что применение ОПА позволит избежать возникновения теневых «призрачных» структур при МФТ визуализации кожи [253].

### **2.3 Выводы**

В данной главе диссертационной работы приведены результаты исследования ОП кожи при помощи МФТ. Эффективность ОП свиной кожи была изучена для различных концентраций растворов глицерина и Омнипак. Было проведено сравнение воздействия данных ОПА на сигналы АФ и ГВГ на различных глубинах в коже. Омнипак был впервые использован для МФТ измерений. Анализ полученных данных показал, что Омнипак является перспективным агентом для ОП кожи,

поскольку он не имеет какого-либо видимого воздействия на морфологию ткани. Несмотря на то, что Омнипак обеспечивает меньший эффект ОП чем глицерин, его воздействия достаточно чтобы значительно улучшить визуализацию кожи на больших глубинах. Таким образом, данный агент возможно использовать не только для рентгенографии, но также для оптической диагностики и лазерного лечения кожных заболеваний. Поскольку Омнипак был изначально разработан для рентгенографии, его применение также открывает дальнейшую перспективу мультимодальной визуализации комбинирующей методы оптической и микро-рентгеновской визуализаций.

## Глава 3

# Исследование влияния оптического просветления кожи на гидратацию коллагена

Применение СКР в клинической практике сильно выросло за последнее десятилетие [254–257], поскольку данный метод обладает большой чувствительностью к молекулярным и структурным изменениям биологических тканей, позволяя при этом проводить измерения с высоким пространственным разрешением. Более того, коммерчески доступные системы спектроскопии КР просты в освоении и полностью автоматизированы. Как уже было сказано в главе 1, КР основано на неупругом (или комбинационном) рассеянии монохроматического света в видимой, ближней инфракрасной или ближней ультрафиолетовой областях длин волн. Взаимодействие света с молекулами вызывает сдвиг энергии фотонов источника света, что позволяет получить уникальный «отпечаток» для каждой молекулы в биологической ткани. Таким образом, спектроскопия КР позволяет дифференцировать между собой воду, коллаген, протеины, жиры, нуклеиновые кислоты и каротиноиды [215, 258], что делает данный метод крайне полезным для ранней *in vivo* диагностики различных кожных заболеваний [210, 256, 259–261], а также для измерения физиологических параметров кожи.

Целью исследования данной главы диссертационной работы было *ex vivo* изучение влияния ОП на спектры КР свиной кожи в области малых волновых чисел (400-2000 см<sup>-1</sup>). Также, целью данного исследования было изучение влияние ОПА на гидратацию коллагена в глубоких слоях дермы.

## 3.1 Материалы и методы

### 3.1.1. Подготовка образцов кожи

В данном исследовании проводилась схожая подготовка образцов кожи с подготовкой описанной в главе 2. Кожа со свиных ушей была выбрана как *ex vivo* модель человеческой кожи за счет близких морфологических свойств [235]. Более того, спектры КР свиной кожи и кожи человека имеют крайне высокую схожесть [217, 229]. Свиные уши поставлялись в лабораторию в день забоя мясником (Gerald Nusche Rind-/Schweineschlachtereі, Кёнигс-Вустерхаузен, Германия). Полученные уши предварительно промывались холодной водой, после чего они просушивались бумажными полотенцами. Далее, образцы кожи размером 1x1 см<sup>2</sup> и толщиной ≈1.2мм подготавливались при помощи скальпеля. Образцы подбирались так, чтобы на них не было шрамов или любых других видимых деформаций. Готовые образцы кожи хранились в холодильнике при температуре +5°С не более двух дней. В общей сложности было подготовлено пять образцов кожи с каждого из восьми ушей от различных свиней. Перед применением ОПА, образцы хранились при комнатной температуре (20±1°С) в течении 30-ти минут. Для обеспечения лучшего проникновения ОПА в образцы, с поверхности кожи при помощи бритвы удалялся волосяной покров. Далее, удалялась поверхностная часть рогового слоя с помощью клейкой ленты (метод *tape stripping*). Для каждого образца данная процедура повторялось 15 раз. Далее образцы кожи обезжиривались при помощи этанола. Аналогичная процедура проводилась также и для контрольных образцов кожи которые в дальнейшем не подвергались обработке ОПА. Образцы подвергавшиеся обработке ОПА, помещались в контейнеры с агентами на протяжении 30-ти и 60-ти минут. Важно отметить, что несмотря на то, что образцы кожи полностью погружались в ОПА, и таким образом подвергались воздействию агента как с эпидермальной так и с дермальной сторон, 60-ти минутного воздействия недостаточно для того, чтобы ОПА проник полностью через все слои кожи [45].

Таким образом, в данном эксперименте не достигалось прямого контакта ОПА с коллагеновыми структурами на всей толщине образца.

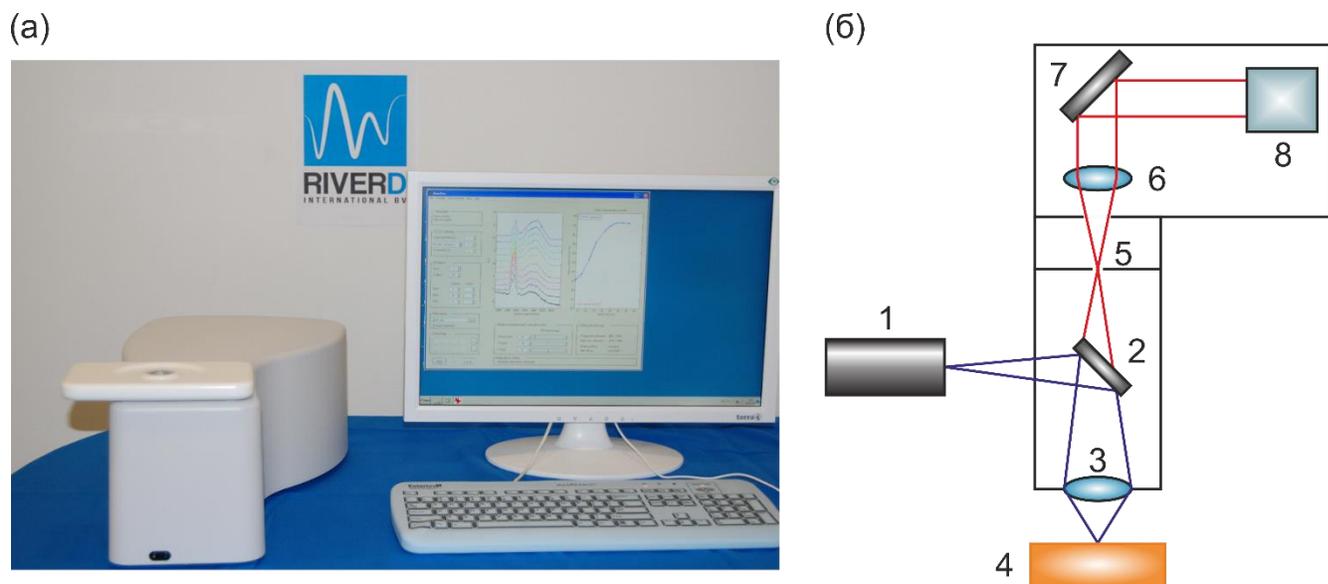
### 3.1.2. Оптические просветляющие агенты

Для данного исследования в качестве ОПА были выбраны Омнипак и глицерин. Согласно работе [246], 70 % раствор глицерина в воде обладает оптимальным соотношением эффективности ОП и скорости проникновения в кожный покров. В связи с этим, в данном исследовании использовался 70 % раствор глицерина. Показатель преломления данного раствора равен  $n=1.428$ , вязкость - 22.5 ср и осмолярность – 9.62 Осм<sup>-1</sup>. Как было показано во предыдущей главе диссертационной работы, 100 % раствор Омнипак (300) показал большую эффективность ОП кожи чем меньшие его концентрации. В связи с этим, в данном исследовании использовался чистый Омнипак (300). Показатель преломления данного раствора равен  $n=1.432$ , вязкость - 11.8 ср и осмолярность – 465 мОсм<sup>-1</sup>.

### 3.1.3. Экспериментальная установка

Измерения спектров КР были проведены при использовании анализатора состава кожи, предназначенного для *in vivo* / *ex vivo* измерений кожи (River Diagnostics, модель 3510 SCA; Роттердам, Нидерланды). Фотография экспериментальной установки и ее оптическая схема представлены на рисунке 9. Следующие параметры были использованы при проведении эксперимента: лазерный источник мощностью 20 мВт на длине волны 785 нм использовался для измерений в спектральной области от 400 см<sup>-1</sup> до 2000 см<sup>-1</sup>. Сигнал от кожи детектировался с использованием масляного объектива ×50. Время экспозиции составляло 5 секунд. Излучение на длине волны 785 нм позволяет глубоко проникать в кожный покров за счет сниженного поглощения и рассеяния кожи в данной области длин волн. Также, использовавшаяся доза возбуждающего излучения не достаточна для того, чтобы повредить компоненты кожи при проведении измерений [262]. Помимо этого,

данная система имеет минимальное влияние эффекта фотобликинга на спектральные линии КР, что обеспечивает возможность проведения сопоставимых измерений КР между различными образцами [241]. Пространственное осевое и спектральное разрешение прибора составляло  $\leq 5\text{мкм}$  и  $2\text{ см}^{-1}$ , соответственно. Данный прибор, также, был подробно описан в работах [257, 258].



**Рисунок 9.** (а) Фотография экспериментальной установки [263]. (б)

Оптическая схема системы СКР. 1 - источник лазерного излучения; 2 – узкополосный фильтр; 3 - фокусирующая линза; 4 - исследуемый объект; 5 – апертура; 6 – коллимирующая линза; 7 – дифракционная решетка; 8 – ПЗС-матрица.

### 3.1.4. План эксперимента

Для исследования эффекта ОП образцы кожи помещались в контейнеры с различными ОПА на период в 30 и 60 минут. Далее, образцы помещались в экспериментальную установку. Перед этим, ОПА удалялись с образцов при помощи бумажных полотенец. Спектры КР кожи измерялись от ее поверхности до глубины 240 мкм с шагом 40 мкм после 30-ти и 60-ти минут воздействия ОПА. Измерения проводились как минимум в пяти различных точках на каждом из образцов. Таким образом, как минимум 40 глубинных профилей спектров КР было получено для

каждого ОПА при 30-ти и 60-ти минутном воздействии, а также для контрольных образцов кожи. Для того, чтобы исследовать непосредственно эффект ОП вызванный проникновением ОПА через поверхность кожи и исключить возможные эффекты проникновения ОПА через боковые края образца, точки для измерения выбирались как можно ближе к центральной области образца. После измерения всех глубинных профилей спектров КР дальнейший анализ осуществлялся при использовании программного обеспечения MatLab 7.11.

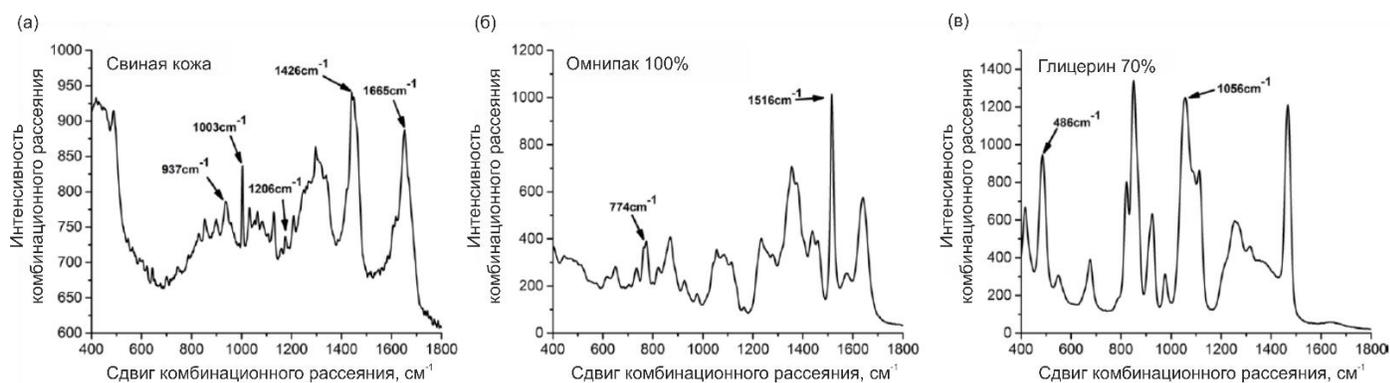
### 3.1.5. Статистический анализ

Статистический анализ был осуществлен при помощи встроенного в MatLab статистического программного пакета (The MathWorks, Natick, MA, США). Для подтверждения статистической разницы между средними значениями спектров КР для контрольных образцов кожи и кожи после воздействия ОПА использовался парный критерий Стьюдента. Далее, статистическая значимость  $p < 0.01$  будет отмечена символом \*\*, а статистическая значимость  $p < 0.05$  будет отмечена символом \*.

## 3.2 Результаты и их обсуждение

На рисунке 10 представлены спектры КР (в области от 400 до 1800  $\text{см}^{-1}$ ) для свиной кожи (поверхностный слой), 100% Омнипак (300) и 70% раствора глицерина. Из рисунка хорошо видно, что по сравнению со свиной кожей уникальные спектральные особенности раствора глицерина проявляются в виде линий КР на 486  $\text{см}^{-1}$  (соответствует кератину в коже) и 1056  $\text{см}^{-1}$  (соответствует липидам в коже). Для Омнипак же уникальные линии КР находятся на 774  $\text{см}^{-1}$  (соответствует кератину в коже) и 1516  $\text{см}^{-1}$  (соответствует каротиноидам в коже). Для корректной оценки воздействия ОПА на эквивалентные глубины для различных образцов определялось положение поверхности кожи для каждого измерения. Омнипак содержит сильный пик сигнала КР расположенный на 1650  $\text{см}^{-1}$  (см. рисунок 10(б)),

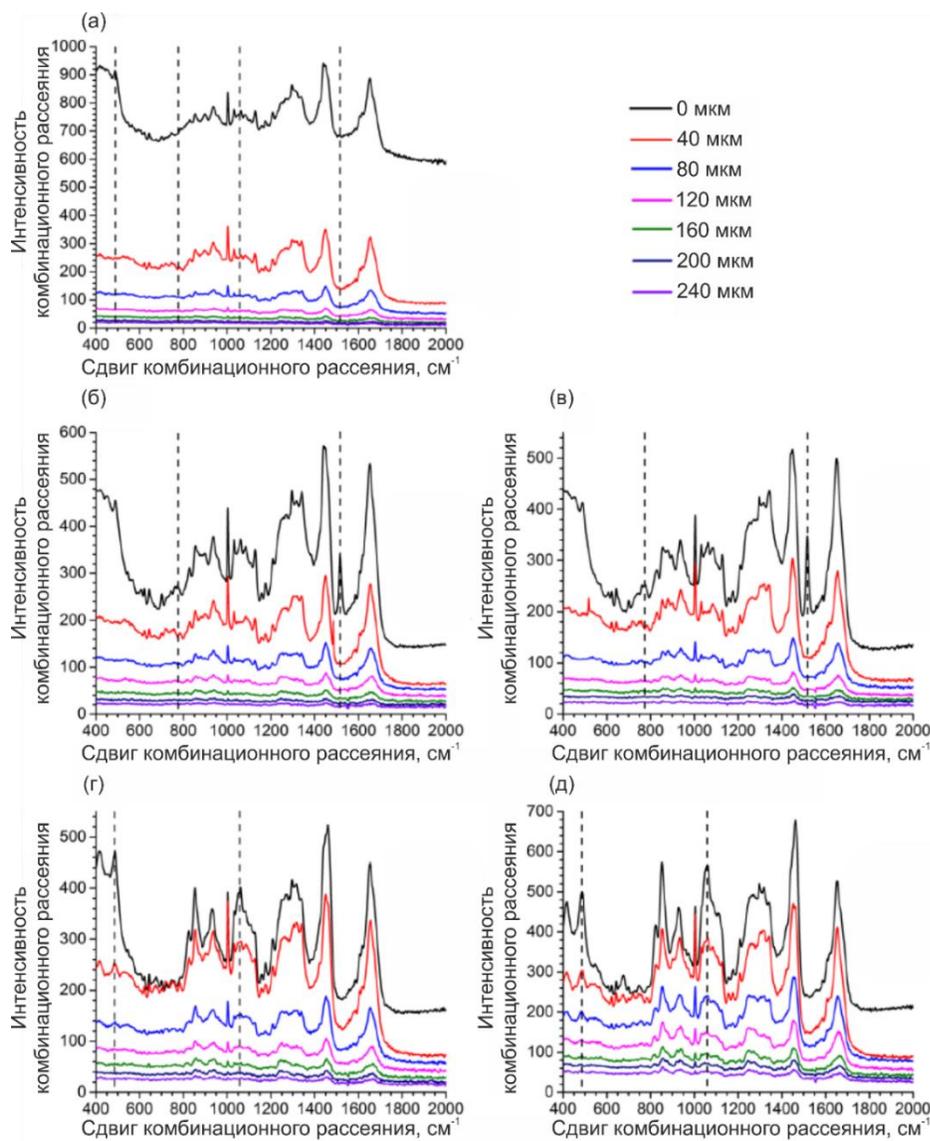
что делает невозможным определение положения поверхности кожи по значению концентрации кератина (линия КР в области  $1600-1700\text{ см}^{-1}$ ). В связи с этим, положение поверхности кожи для каждого измерения определялось путем расчета AUC (область под кривой) линии КР соответствующего фенилаланину/мочевине (спектральная область  $998-1008\text{ см}^{-1}$ ). Данная линия не пересекается с линиями КР Омнипак. Таким образом положение поверхности кожи определялось как половина между минимальным и максимальным значением AUC [71].



**Рисунок 10.** Спектры КР для кожи со свиного уха (а), 100% Омнипак (300) (б) и 70% глицерина (в).

На рисунке 11 приведены примеры спектров КР для контрольного образца кожи (см. рисунок 11(а)) и для образцов кожи после воздействия ОПА (см. рисунки 11(б-д)) на глубинах от 0 до 240 мкм. Спектр КР для кожи может быть охарактеризован наличием линий на  $937\text{ см}^{-1}$  (белковая альфа спираль),  $1003\text{ см}^{-1}$  (фенилаланин / мочевина),  $1244\text{ см}^{-1}$  (амид III),  $1272\text{ см}^{-1}$  (амид III),  $1426\text{ см}^{-1}$  (валентные колебания С-С связи) и на  $1665\text{ см}^{-1}$  (амид I). Важно отметить, что из-за тесного соприкосновения поверхности кожи с покровным стеклом микроскопа КР во время проведения измерений, все спектры КР для поверхности кожи (0 мкм) содержали вклад от кварцевого стекла в области  $400-550\text{ см}^{-1}$ . Данный вклад пропадал на более глубоких слоях кожи. Также вклад от кварцевого стекла накладывался на вклад от линии КР соответствующий глицерину ( $486\text{ см}^{-1}$ ) (см.

рисунки 11(г) и 11(д)) для поверхности кожи, но не влиял на результаты измерений для более глубоких слоев.



**Рисунок 11.** Примеры спектров КР свиной кожи в зависимости от глубины внутри образца для контрольного образца кожи без воздействия ОПА (а); для образца кожи после 30-ти минутного (б) и 60-ти минутного (в) воздействия Омнипак; для образца кожи после 30-ти минутного (г) и 60-ти минутного (д) воздействия 70% раствором глицерина. Вертикальные пунктирные линии соответствуют уникальным линиям КР для Омнипак на  $774\text{ см}^{-1}$  и  $1516\text{ см}^{-1}$  (б, в) и уникальным линиям КР для глицерина на  $486\text{ см}^{-1}$  и  $1056\text{ см}^{-1}$  (г, д).

Кожа обладает крайне высоким рассеянием в видимой и инфракрасной областях длин волн. Рассеяние, в свою очередь, существенно ослабляет как падающее на кожу возбуждающее излучение, так и сигнал КР принимаемый микроскопом КР. Таким образом, сильное рассеяние поверхностного слоя кожи радикально снижает глубину детектирования данным методом. Из рисунка 11(а) хорошо видно, что сигнал КР для контрольного образца кожи без воздействия ОПА монотонно убывает с увеличением глубины зондирования. На глубине более 200 мкм линии КР соответствующие коже перестают быть различимы на фоне флуоресценции. Применение же ОПА позволяет в значительной степени улучшить качество спектров КР для глубоких слоев кожи.

Для изучения эффекта ОП было проведено сравнение спектров КР для контрольных образцов кожи без воздействия ОПА и образцов кожи после воздействия глицерина и Омнипак. Из рисунка 11 видно, что спектр КР полученный на поверхности (0 мкм) контрольного образца кожи без воздействия ОПА обладает в два раза большей интенсивностью, чем спектр КР поверхности образцов обработанных обоими ОПА. Это происходит из-за сильного насыщения поверхностного слоя кожи проникнувшими внутрь ОПА, что хорошо видно в качестве присутствующих в спектре КР линий глицерина (486 см<sup>-1</sup> и 1056 см<sup>-1</sup> (см. рисунок 11(б) и 11(в))) и Омнипак (774 см<sup>-1</sup> и 1516 см<sup>-1</sup> (см. рисунок 11(г) и 11(д))). Также, из рисунков видно, что глицерин проникает в кожу значительно глубже, чем Омнипак. За 60 минут воздействия глицерином, он проникает на глубину 160 мкм, в то время как Омнипак за то же время проникает не глубже 40 мкм. Значительное улучшение интенсивности спектров КР хорошо видно после воздействия обоих ОПА. В таблице 3 приведена численная информация по изменению принципиальных линий КР кожи после применения обоих ОПА, рассчитанная по формуле

$$E_{\Delta} = \frac{I_{\text{ОПА}}}{I_{\text{контр}}}, \quad (4)$$

где  $E_{\Delta}$  – коэффициент увеличения интенсивности сигнала КР для принципиальной линии кожи,  $I_{\text{ОПА}}$  – интенсивность сигнала КР для принципиальной линии кожи после применения ОПА,  $I_{\text{контр}}$  – интенсивность сигнала КР для принципиальной линии контрольного образца без воздействия ОПА.

Таблица 3. Средние коэффициенты увеличения интенсивности сигнала КР кожи для линий на  $937 \text{ см}^{-1}$ ,  $1003 \text{ см}^{-1}$ ,  $1244 \text{ см}^{-1}$ ,  $1272 \text{ см}^{-1}$ ,  $1426 \text{ см}^{-1}$  и  $1665 \text{ см}^{-1}$  после применения глицерина и Омнипак в сравнении с контрольными образцами кожи (отношение интенсивности линий КР после применения ОПА к интенсивности линий КР до применения ОПА).  $p \leq 0.05$  обозначен «\*».  $p \leq 0.01$  обозначен «\*\*».

Линии КР		$937 \text{ см}^{-1}$	$1003 \text{ см}^{-1}$	$1244 \text{ см}^{-1}$	$1272 \text{ см}^{-1}$	$1426 \text{ см}^{-1}$	$1665 \text{ см}^{-1}$
Глубина: 0 мкм							
Омнипак, мин	30	0.48	0.54	0.51	0.52	0.49	0.55
Омнипак, мин	60	0.43	0.47	0.46	0.46	0.44	0.5
Глицерин, мин	30	0.45	0.48	0.45	0.47	0.42	0.48
Глицерин, мин	60	0.56	0.57	0.58	0.60	0.52	0.56
Глубина: 40 мкм							
Омнипак, мин	30	0.79	0.81	0.80	0.79	0.78	0.87
Омнипак, мин	60	0.80	0.82	0.80	0.79	0.79	0.86
Глицерин, мин	30	1.04	1.04	1.07	1.05	1.00	1.05
Глицерин, мин	60	1.26*	1.23*	1.23*	1.28*	1.21*	1.24*
Глубина: 80 мкм							
Омнипак, мин	30	1.00	0.97	1.04	1.03	1.03	1.03
Омнипак, мин	60	0.95	0.94	1.00	1.00	0.99	1.01
Глицерин, мин	30	1.18*	1.19*	1.26*	1.26*	1.21	1.20*
Глицерин, мин	60	1.77**	1.77**	1.77*	1.91*	1.82**	1.77**
Глубина: 120 мкм							
Омнипак, мин	30	1.10	1.21	1.25	1.18	1.09	1.04

Омнипак, мин	60	1.24*	1.22	1.14	1.10	1.18	1.16*
Глицерин, мин	30	1.41*	1.35*	1.44*	1.43*	1.42*	1.52*
Глицерин, мин	60	1.9*	1.46*	2.29*	2.39*	1.51*	1.83*
Глубина: 160 мкм							
Омнипак, мин	30	1.11	1.19	1.20	1.29	1.12	1.11
Омнипак, мин	60	1.25*	1.31*	1.22*	1.27*	1.29*	1.28*
Глицерин, мин	30	1.43*	1.50*	1.62*	1.62*	1.36*	1.52*
Глицерин, мин	60	1.94*	1.36*	2.55*	2.75**	1.45*	1.99*
Глубина: 200 мкм							
Омнипак, мин	30	1.26	1.26	1.37	1.39	1.22	1.16
Омнипак, мин	60	1.40*	1.43*	1.45*	1.52*	1.35*	1.51*
Глицерин, мин	30	1.58*	1.48*	1.78*	1.78*	1.38*	1.49*
Глицерин, мин	60	2.21*	1.55*	2.95*	3.21*	1.50*	2.17*
Глубина: 240 мкм							
Омнипак, мин	30	1.07*	1.12*	1.21*	1.35*	1.33*	1.22*
Омнипак, мин	60	1.21*	1.19*	1.31*	1.29*	1.44*	1.29*
Глицерин, мин	30	1.45	1.41*	1.82*	1.82*	1.64*	1.38**
Глицерин, мин	60	2.32**	1.55**	2.87*	3.24**	1.96**	2.66**

Таким образом, за период 30-ти и 60-ти минутного воздействия глицерин успевает проникнуть в эпидермис, а также провзаимодействовать с коллагеном в папиллярной дерме. Омнипак же, напротив, проникает только в верхнюю часть эпидермиса, не успевая проникнуть дальше в дерму. 60-ти минутное воздействие показало более эффективное ОП чем воздействие в течении 30-ти минут для обоих ОПА (см. таблицу 3). Не смотря на то, что Омнипак не проникал в дерму, эффект ОП отчетливо виден и на больших глубинах внутри объекта. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что воздействие ОПА с роговым

слоем и дальнейшее снижение его коэффициента рассеяния вносит существенный вклад в эффективность ОП дермы. Также, применение обоих ОПА приводит к значительному улучшению как соотношения сигнал-шум так и контраста сигнала КР. Данный результат хорошо согласуется с результатами описанными в работе [222]. Более того, многие линии спектра КР полученные после ОП обоими агентами имели лучшую статистическую значимость ( $p \leq 0.05$  на глубинах 40, 120, 160 и 200 мкм и  $p \leq 0.01$  на глубинах 80 и 240 мкм после 60-ти минутного применения глицерина;  $p \leq 0.05$  на глубинах 160, 200 и 240 мкм после 60-ти минутного применения Омнипак. Данный результат хорошо согласуется с результатами приведенными в работе [46], где при помощи спектроскопии КР исследовался глицерин. Также, в работе [43, 264], где использовался ОКТ, описано улучшение статистической значимости при применении ОПА. Более того, полученные данные подтверждают верность выводов основанных на результатах исследования описанного во второй главе текущей диссертационной работы.

Коллаген является одной из доминирующих компонент дермы, что делает его важным объектом при исследовании кожного покрова. ОП позволяет улучшить качество спектроскопического КР анализа кожи. Мониторинг изменения структуры коллагена и характер его взаимодействия с ОПА, водой и т.д. является приоритетным направлением современной дерматологии. Для того, чтобы исследовать влияние ОПА на коллагеновые структуры был проведен анализ линий КР соответствующих коллагену. Были выбраны линии КР на  $937 \text{ см}^{-1}$  (белковая альфа спираль),  $1244 \text{ см}^{-1}$  (амид III),  $1272 \text{ см}^{-1}$  (амид III) и  $1665 \text{ см}^{-1}$  (амид I). Численный анализ среднего изменения интенсивности коллагеновых линий КР после воздействия Омнипак и глицерина приведен в таблице 3. Расчеты производились по формуле (4). Из таблицы хорошо видно, что интенсивности всех коллагеновых линий КР увеличились после применения обоих ОПА. Данный эффект может быть объяснен тем, что применение ОПА приводит к более плотной организации коллагеновых структур [265]. 60-ти минутное применение глицерина

вызывало более сильное увеличение интенсивности линий КР по сравнению с Омнипак. Данная разница в эффективности ОП коллагена объясняется тем, что глицерин вызывает сильное сжатие и дегидратацию кожного покрова. Таким образом, коллагеновые структуры после применения глицерина значительно более плотно упакованы, чем после применения Омнипак.

Для оценки гидратации коллагена при применении ОПА было рассчитано отношение между линиями КР на  $938\text{ см}^{-1}$  и  $922\text{ см}^{-1}$  по формуле:

$$H = \frac{I_{938}}{I_{922}}, \quad (5)$$

где  $H$  – степень гидратации коллагена в коже,  $I_{938}$  – интенсивность линии КР на  $938\text{ см}^{-1}$ ,  $I_{922}$  – интенсивность линии КР на  $922\text{ см}^{-1}$ .

Данное соотношение широко используется в качестве маркера гидратации коллагена [266, 267]. Линия КР на  $922\text{ см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям С-С связей, а линия на  $938\text{ см}^{-1}$  соответствует колебаниям валентных С-С связей скелета коллагеновой цепи. Увеличение соотношения  $I_{938}/I_{922}$  свидетельствует от повышении гидратации коллагена. В таблице 4 приведен численный анализ среднего соотношения  $I_{938}/I_{922}$  для образцов кожи после воздействия глицерином и Омнипак на различных глубинах. Перед расчетом соотношения, предварительно была произведена корректировка на нулевую линию и последующая нормировка на амид I ( $1590\text{-}1720\text{ см}^{-1}$ ). Из таблицы 4 хорошо видно, что 30-ти и 60-ти минутное воздействие глицерином привело к сильной дегидратации вплоть до глубины 120 мкм. В тоже время, 30-ти и 60-ти минутное воздействие Омнипак на тех же глубинах оказывало значительно меньший эффект. Максимальная дегидратация (отношение значения гидратации коллагена до ОП к гидратации коллагена после ОП) после 60-ти минутного воздействия Омнипак достигалось на глубине 200мкм в  $1.18\pm 0.09$  раз). Для 60-ти минутного воздействия глицерином максимальная дегидратация достигалась на глубине 80 мкм (в  $1.66\pm 0.07$  раз). Статистическая

разница между эффектом от воздействия глицерина и Омнипак на глубинах 0-80 мкм составляла  $p \leq 0.01$ .

Как уже было сказано выше, спектроскопия КР позволяет получить информацию о глубине проникновения ОПА внутрь кожи. Линии КР соответствующие глицерину были зафиксированы на глубине 160 мкм после 60-ти минутного воздействия, в то время как линии КР для Омнипак были обнаружены на глубине не превышающей 40 мкм. Данная информация является подтверждением того, что Омнипак имеет ограниченную проникающую способность в кожу по сравнению с глицерином. Таким образом, даже после 60-ти минутного воздействия Омнипак не вступает в прямое взаимодействие с глубоко расположенной дермой. Также, важно отметить, что применение обоих ОПА способствовало значительному увеличению интенсивности линии КР на  $1003 \text{ см}^{-1}$ , который используется для диагностики рака кожи [268, 269].

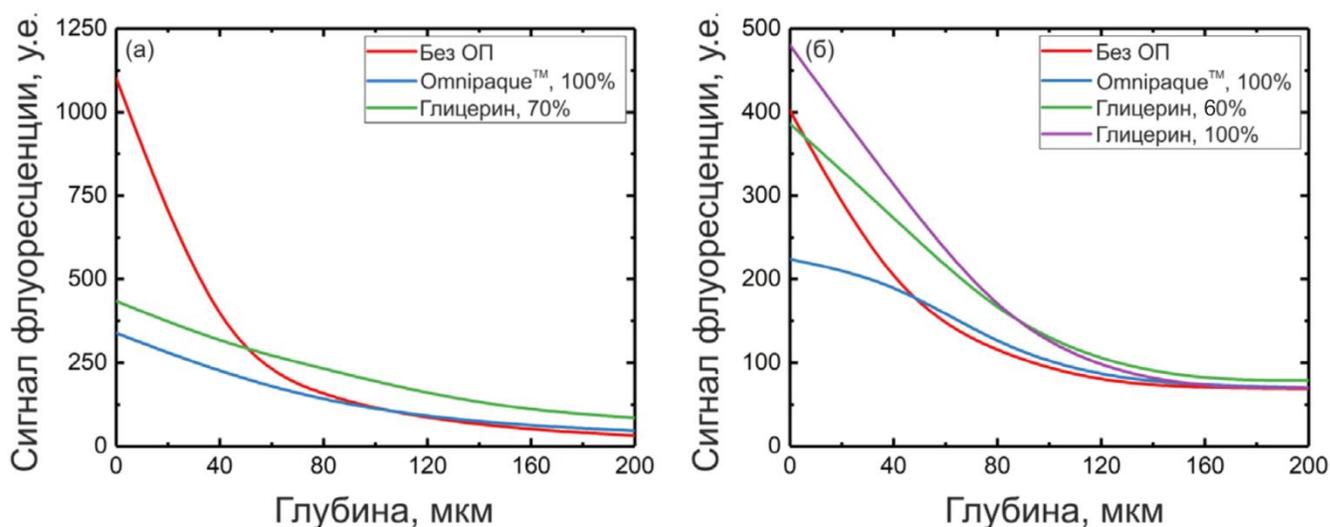


Рисунок 12. Значение фоновой флуоресценции спектров КР (длина волны возбуждения 785 нм) для образцов кожи, обработанных 70% раствором глицерина, 100% раствором Омнипак и контрольных образцов (а); значение флуоресценции ДФТ (длина волны возбуждения 760 нм) для образцов кожи обработанных 60% и 100% растворами глицерина, 100% раствором Омнипак и контрольных образцов (б).

Таблица 4. Зависимость среднего отношения интенсивности линий КР  $I_{938}/I_{922}$  для контрольных образцов кожи без воздействия ОПА и образцов кожи после воздействия глицерином и Омнипак на различных глубинах.

$p \leq 0.05$  обозначен «\*».  $p \leq 0.01$  обозначен «\*\*».

ОПА/глубина	0 мкм	40 мкм	80 мкм	120 мкм	160 мкм	200 мкм	240 мкм
Кожа без ОПА	1.19± 0.1	1.27± 0.06	1.65± 0.04	1.67± 0.04	1.70± 0.13	1.62± 0.14	1.54± 0.25
Омнипак, 30 мин	1.23± 0.03	1.34± 0.04*	1.46± 0.03	1.21± 0.05*	1.37± 0.03*	1.48± 0.05	1.25± 0.2
Омнипак, 60 мин	1.10± 0.03	1.34± 0.03	1.59± 0.04	1.43± 0.06*	1.50± 0.05*	1.37± 0.08*	1.52± 0.15
Глицерин, 30 мин	0.90± 0.03	1.11± 0.04*	1.02± 0.03*	1.27± 0.05*	1.34± 0.04*	1.32± 0.01*	1.29± 0.1
Глицерин, 60 мин	0.78± 0.04*	0.88± 0.05*	0.99± 0.05*	1.34± 0.04**	1.45± 0.05**	1.42± 0.03*	1.28± 0.07

Таким образом, не смотря на меньшую эффективность ОП Омнипак по сравнению с глицерином, Омнипак является перспективным агентом для дальнейшего *in vivo* применения на коже. Его эффективность ОП является значительной на глубинах превышающих 160 мкм ( $p \leq 0.05$ ). Безопасность его применения подтверждается тем, что данный агент сертифицирован для медицинского применения [270]. Также, как уже было сказано выше, низкая вязкость Омнипак (11.8 ср) позволяет ему быстрее проникать в кожу и начинать процесс ОП. В тоже время, он не проникает глубоко в кожу, а его низкая осмолярность (465 мОсмл<sup>-1</sup>) позволяет Омнипак избежать резкой структурной деформации и нарушения барьерной функции кожного покрова. Суммируя результаты приведенные в данной главе, а также во второй главе данной диссертационной работы, можно сделать вывод, что Омнипак вызывает значительно меньшую дегидратацию и последующее сжатие кожи по сравнению с глицерином. Важно отметить, что сигнал КР сильно зависит от упругого рассеяния [225, 226]. Поскольку применение ОПА вызывает уменьшение рассеяния, нужно соблюдать оптимальное соотношение между эффективностью ОП и интенсивностью сигнала

КР [227]. В связи с этим, Омнипак является более предпочтительным, чем глицерин для измерений спектров КР за счет того, что длительное применение глицерина может избыточно уменьшить рассеяние в биологических тканях. Совместное применение Омнипак и химических усилителей проникновения ОПА в кожу, таких как ДМСО [38, 41, 167, 169, 182], олеиновая кислота [167, 271] или гиалуроновая кислота [49], может значительно увеличить эффективность ОП при сокращении времени его применения.

Также, используя результаты исследований приведенные в предыдущей и текущей главах диссертационной работы, было оценено влияние ОПА на флуоресценцию свиной кожи. На рисунке 12 представлены для сравнения данные для микроскопии КР (см. рисунок 12(а)) и ДФТ (см. рисунок 12(а)). Для микроскопии КР флуоресценция рассчитывалась как интегральное значение фоновой флуоресценции. Для ДФТ бралась интенсивность сигнала АФ.

Из рисунка 12(а) видно, что применение обоих ОПА приводит к значительному снижению фоновой флуоресценции на глубинах до 50 мкм за счет проникновения ОПА внутрь кожи. На больших глубинах фоновая флуоресценция для образцов, обработанных Омнипак сравнима с флуоресценцией для контрольных образцов, в то время как применение глицерина вызывает рост фоновой флуоресценции. Данный эффект для глицерина связан с тем, что больше возбуждающего света попадает к глубоко лежащим флуорофорам за счет снижения рассеяния. Кроме того, выход наружу флуоресценции также выше за счет снижения рассеяния. Из рисунка 12(б) видно, что применение Омнипак также вызывает значительное снижение сигнала АФ на глубинах (до 50 мкм) за счет иммерсии ОПА. На глубинах 50 мкм – 160 мкм сигнал АФ для образцов, обработанных Омнипак, несколько больше, чем для контрольных образцов. На глубинах более 160 мкм их значение сравнивается. Важно отметить, что обработка кожи 60% раствором глицерина приводит к увеличению сигнала АФ по сравнению с контрольными

образцами на всех глубинах за исключением поверхности кожи. Применение чистого глицерина также приводит к росту сигнала АФ вплоть до глубины 160 мкм. Подобный эффект, вызываемый глицерином, возможно, возникает за счет уменьшения рассеяния в связи с сильной дегидратацией кожного покрова.

### **3.3 Выводы**

В данной главе диссертационной работы были показаны результаты *ex vivo* изучения эффекта ОП оказываемого растворами глицерина и Омнипак на свиную кожу после применения в течении 30-ти и 60-ти минут при помощи СКР. Эффективность воздействия глицерина и Омнипак были сравнены с контрольными образцами кожи (не подвергавшимися обработке ОПА) на глубинах от 0 мкм до 240 мкм. Результаты исследований показали, что интенсивность линий КР типичных для кожи существенно увеличивалась на глубинах превышающих 160 мкм после применения Омнипак и на глубинах превышающих 40 мкм после применения глицерина. Также было изучено влияние применения ОПА на гидратацию коллагена. Для этого было исследовано изменение соотношения линий КР 938/922 см<sup>-1</sup>. Результаты показали, что Омнипак вызывает меньшую дегидратацию коллагена по сравнению с глицерином. Изучение воздействия Омнипак на гидратацию коллагена было осуществлено впервые при помощи спектроскопии КР в данной работе.

## Глава 4

# Исследование влияния оптического просветления на различные типы водородных связей в коже

Как уже было упомянуто в третьей главе данной диссертационной работы, спектроскопия КР используется для ранней диагностики кожных заболеваний и мониторинга физиологических параметров кожи. Помимо этого, спектроскопия КР получила широкое распространение в косметологии [23, 214, 254, 256, 257, 272]. Также, данный метод активно используется для определения глубины проникновения различных субстанций в кожный покров [38, 71, 182, 217, 273, 274]. В работе [275] был представлен метод позволяющий рассчитать объемную концентрацию воды на различных глубинах в коже. Данный метод был основан на расчете соотношений интенсивности полос спектров КР соответствующих воде ( $3350\text{-}3550\text{ см}^{-1}$ ) и протеину ( $2910\text{-}2965\text{ см}^{-1}$ ). В работе [276] было показано, что содержание воды в дерме может быть измерено *in vivo* при помощи спектроскопии КР на глубинах вплоть до 200 мкм. В работе [73] показана возможность расчета содержания различных типов молекул воды (связанная, частично связанная и несвязанная вода) в роговом слое кожи. Данный метод использует деконволюцию функций Гаусса для полос спектра КР в области от  $3100$  до  $3700\text{ см}^{-1}$ . Далее, в работе [277] было *in vivo* показано распределение различных типов воды в зависимости от водородной связи в роговом слое кожи человека. В частности, было показано что сильно связанная вода (DDAA–ОН: два донора, два акцептора) и слабо связанная вода (DA–ОН: один донор, один акцептор) составляют вместе около 90% от общего количества воды в роговом слое, в то время как жестко связанная вода

(DAA–ОН: один донор, два акцептора) и несвязанная вода (суперпозиция очень слабо связанной воды DDA–ОН: два донора, один акцептор и свободной воды) составляют всего лишь <10% от общего количества воды.

Целью исследования данной главы диссертационной работы было изучение влияния ОП на различные типы молекул воды в зависимости от водородной связи в свиной коже. Данное исследование было проведено *ex vivo* при использовании метода деконволюции [73] на глубинах вплоть до 200 мкм (ретикулярная дерма). Поскольку длительное применение ОПА может оказывать негативные эффекты на кожный покров, важно исследовать воздействие ОПА на состав воды в коже. Полученная информация позволит найти оптимальный ОПА, его концентрацию и время воздействия для быстрого и безопасного ОП при *in vivo* применении.

## **4.1 Материалы и методы**

### **4.1.1. Подготовка образцов кожи**

В данном исследовании процесс подготовки образцов кожи был аналогичен с процессом описанном в главах 2 и 3. Несмотря на то, что свиная кожа использовавшаяся для экспериментальных измерений обладает схожими гистологическими, морфологическими и иммуногистохимическими свойствами с кожей человека, в работе [224] при помощи спектроскопии КР было установлено, что *ex vivo* роговой слой свиной кожи обладает меньшей барьерной функцией по сравнению с *in vivo* кожей человека. Свиные уши поставлялись в лабораторию в день забоя мясником (Gerald Nusche Rind-/Schweineschlachtereі, Кёнигс-Вустерхаузен, Германия). Полученные уши предварительно промывались холодной водой, после чего они просушивались бумажными полотенцами. Далее, образцы кожи размером 1x1 см<sup>2</sup> и толщиной ≈1.2мм подготавливались при помощи скальпеля. Готовые образцы кожи хранились в холодильнике при температуре +5°C не более двух дней. В общей сложности было подготовлено по пять образцов кожи с

восемью ушей от различных свиней. Перед применением ОПА, образцы кожи хранились при комнатной температуре ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) в течении 30 минут. Для обеспечения лучшего проникновения ОПА в образцы, с поверхности кожи при помощи бритвы удалялся волосяной покров. Далее удалялась часть рогового слоя с помощью клейкой ленты (метод *tape stripping*). Для каждого образца данная процедура повторялась 15 раз. Далее образцы кожи обезжиривались при помощи этанола. Аналогичная процедура проводилась также и для контрольных образцов кожи, которые в дальнейшем не подвергались обработке ОПА. Образцы подвергавшиеся обработке ОПА, помещались в контейнеры с агентами на протяжении 30-ти и 60-ти минут. Важно отметить, что не смотря на то, что образцы кожи полностью погружались в ОПА, и таким образом подвергались воздействию агента как с эпидермальной так и с дермальной сторон, 60-ти минутного воздействия не достаточно для того, чтобы ОПА проник полностью через все слои кожи [45, 47]. Таким образом, в данном эксперименте не достигалось прямого контакта ОПА с коллагеновыми структурами на всей толщине образца.

Разрешение на проведение исследования было получено от Ветеринарного совета, Район Берлина Трептов-Кёпеник, Германия.

#### **4.1.2. Оптические просветляющие агенты**

Для данного исследования в качестве ОПА, аналогично с главой 3, были выбраны 100% Омнипак (300) и 70 % раствор глицерина. Показатель преломления данного раствора равен  $n=1.428$ , вязкость - 22.5 ср и осмолярность –  $9.62 \text{ Осм}^{-1}$ . Показатель преломления 100% Омнипак равен  $n=1.432$ , вязкость - 11.8 ср и осмолярность –  $465 \text{ мОсм}^{-1}$ .

#### **4.1.3. Экспериментальная установка**

Измерения спектров КР были проведены при использовании анализатора состава кожи, предназначенного для *in vivo* / *ex vivo* измерений кожи (River

Diagnosics, модель 3510 SCA; Роттердам, Нидерланды). Фотография и оптическая схема установки приведены на рисунке 9. Следующие параметры были использованы при проведении эксперимента: лазерный источник мощностью 19 мВт на длине волны 671 нм использовался для измерений в области больших волновых чисел (2000-4000 см<sup>-1</sup>). Сигнал от кожи детектировался с использованием масляного объектива ×50. Время экспозиции составляло 1 секунду. Для определения поверхности кожи использовались настройки описанные в главе 3 данной диссертационной работы: лазерный источник мощностью 20 мВт на длине волны 785 нм использовался для получения изображений в спектральной области от 400 см<sup>-1</sup> до 2000 см<sup>-1</sup> при времени экспозиции 5 секунд. Пространственное и спектральное разрешения описанной системы составляли ≤5мкм и 2 см<sup>-1</sup>, соответственно. Используемые дозы лазерного излучения находились в пределах безопасного условия применения. Также, несмотря на генерацию свободных радикалов [278, 279] и локальное увеличение температуры [262], используемые дозы лазерного излучения не влияли на состав компонент кожи.

#### **4.1.4. План эксперимента**

Для исследования эффекта ОП на содержание воды в коже образцы кожи помещались в контейнеры с различными ОПА на период в 30 и 60 минут. Далее, образцы помещались в экспериментальную установку. Перед этим, ОПА удалялись с образцов при помощи бумажных полотенец. Спектры КР кожи измерялись от ее поверхности до глубины 240 мкм с шагом 40 мкм после 30 и 60 минут воздействия ОПА. Измерения проводились как минимум в пяти различных точках на каждом из образцов. Таким образом, как минимум 40 глубинных профилей спектров КР было получено для каждого ОПА при 30-ти и 60-ти минутном воздействии, а также, для контрольных образцов кожи. После измерения всех глубинных профилей спектров КР дальнейший анализ осуществлялся при использовании программного обеспечения MatLab R2017b.

## 4.2. Обработка данных

### 4.2.1. Деконволюция спектров комбинационного рассеяния

В первую очередь, для улучшения качества полученных данных была проведена фильтрация шумов, к которым были отнесены слабо меняющиеся компоненты спектра КР в области больших длин волн. Фильтрация производилась при помощи метода главных компонент [22, 71]. Для восстановления спектра КР были использованы четыре первые главные компоненты. Далее, при помощи метода описанного в главе 3 данной диссертационной работы, определялось положение поверхности кожи.

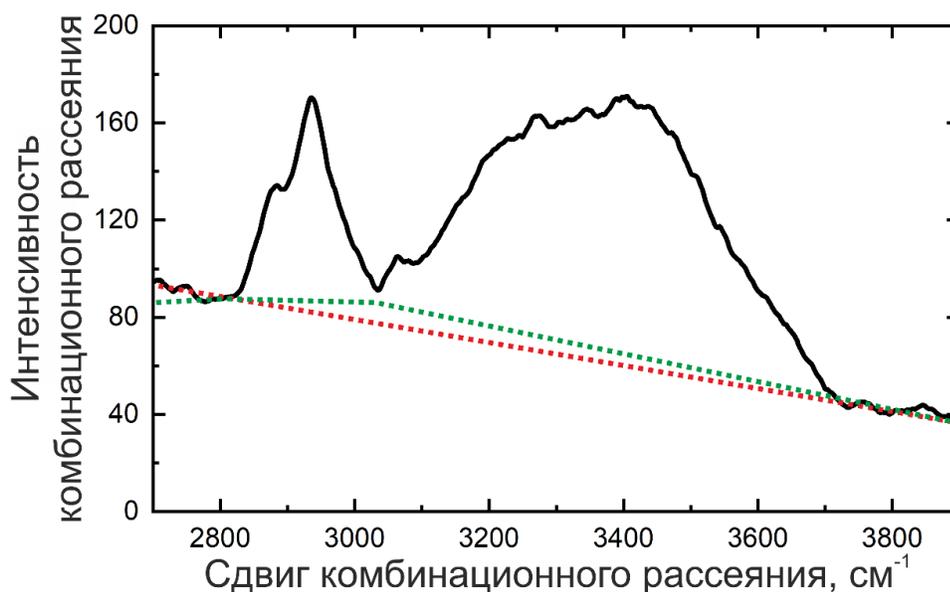


Рисунок 13. Процедура удаления базовой линии спектра КР кожи. Черная линия – спектр КР свиной кожи. Красная пунктирная линия – линейное удаление базовой линии. Зеленая пунктирная линия – удаления базовой линии по методу предложенному в работе [277].

Поскольку во время измерений сильная флуоресценция кожи накладывается на спектр КР молекулярных колебаний, также было необходимо провести процедуру удаления базовой линии. В данном исследовании использовался метод

предложенный в работе [277]. Спектральные области от  $2770 \text{ см}^{-1}$  до  $2810 \text{ см}^{-1}$  и от  $3750 \text{ см}^{-1}$  до  $3900 \text{ см}^{-1}$  не содержат никаких линий КР, и поэтому могут служить критерием, определяющим форму базовой линии. В работе [258] применялось вычитание линейной базовой линии, что является простым в исполнении методом. Тем не менее, данный подход не учитывает разные градиенты в областях от  $2600 \text{ см}^{-1}$  до  $2820 \text{ см}^{-1}$  и от  $3800 \text{ см}^{-1}$  до  $3900 \text{ см}^{-1}$ . Полиномиальные функции второго и третьего порядков также не способны точно описать базовую линию, поскольку область от  $3750 \text{ см}^{-1}$  до  $3900 \text{ см}^{-1}$  является практически линейной, а подбор точек интерполяции для области от  $3030 \text{ см}^{-1}$  до  $3100 \text{ см}^{-1}$  является нетривиальной задачей. В связи с этим, для решения описанных проблем и для корректного моделирования базовой линии кожи был использован метод подбора наименьших взвешенных квадратов [280]. Таким образом, сначала базовая линия моделировалась при помощи квадратного полинома, имевшего точки интерполяции с весом 1, 0.1 и 1 для областей  $3800\text{-}3900 \text{ см}^{-1}$ ,  $3034\text{-}3042 \text{ см}^{-1}$  и  $2776\text{-}2810 \text{ см}^{-1}$ , соответственно. Далее, метод наименьших квадратов с использованием линейной функции был применен в области  $3034\text{-}3900 \text{ см}^{-1}$  в качестве продолжения базовой линии. В заключении, ранее полученная при помощи полиномиальной функции второго порядка базовая линия была адаптирована для области  $2770\text{-}3034 \text{ см}^{-1}$ . На рисунке 13 показана разница между линейным удалением базовой линии и методом удаления базовой линии предложенным в работе [277].

После удаления базовой линии была проведена процедура деконволюции линий КР в области больших волновых чисел ( $2770\text{-}3900 \text{ см}^{-1}$ ) при помощи 10 функций Гаусса (см. рисунок 14) [277]. Выбор функции для процедуры деконволюции является открытым вопросом. В ряде работ используется функция Гаусса-Лоренца [73, 281] для измерений на коже. Некоторые работы используют только функцию Гаусса [282]. В работе [283] было показано, ошибка при

аппроксимации данных с использованием функции Гаусса меньше по сравнению с другими функциями.

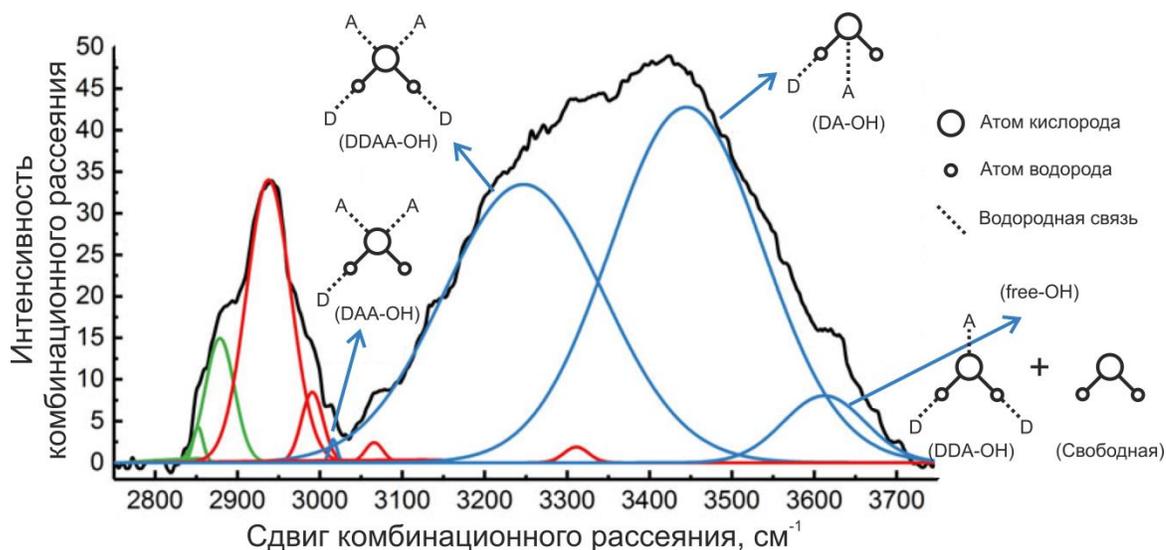


Рисунок 14. Деконволюция спектра КР свиной кожи (глубина 80 мкм) при использовании функции Гаусса. Черный цвет соответствует коже, зеленый - жирам, красный - протеинам, синий – различным типам воды (DAA-ОН, DDAA-ОН, DA-ОН и free-ОН).

Для каждой исследуемой глубины 4 функции Гаусса были присвоены линиям КР 100 на  $2850 \pm 5$  см<sup>-1</sup>,  $2800 \pm 5$  см<sup>-1</sup>,  $2930 \pm 5$  см<sup>-1</sup> и  $2980 \pm 5$  см<sup>-1</sup> для того чтобы промоделировать область липидов и кератинов ( $2820-3030$  см<sup>-1</sup>). Далее, для области  $3000-3800$  см<sup>-1</sup> была произведена процедура деконволюции с использованием 6 функций Гаусса. Из них 4 функции Гаусса были центрированы на линиях соответствующих 4 типам воды в коже в зависимости от силы водородных связей:  $3005 \pm 5$  см<sup>-1</sup> (жестко связанная вода, DAA-ОН: один донор, два акцептора),  $3277 \pm 5$  см<sup>-1</sup> (сильно связанная вода, DDAA-ОН: два донора, два акцептора),  $3458 \pm 5$  см<sup>-1</sup> (слабо связанная вода, DA-ОН: один донор, один акцептор) и  $3604 \pm 5$  см<sup>-1</sup> (несвязанная вода, free-ОН, суперпозиция очень слабо связанной воды DDA-ОН: два донора, один акцептор; и свободной воды). Далее, для анализа содержания воды рассчитывались площади под кривой для каждой из 4-х функций Гаусса.

Полученные значения нормировались на значение площади под кривой для функции Гаусса центрированной на  $2930 \pm 5 \text{ см}^{-1}$  (протеин). Также, 2 функции Гаусса были центрированы на линиях  $3060 \pm 5 \text{ см}^{-1}$  и  $3330 \pm 5 \text{ см}^{-1}$ . Данные линии моделируют ненасыщенную метиленовую полосу белков и полосу колебания белка NH, соответственно. Ширина каждой функции Гаусса на различных глубинах внутри кожи могла варьироваться в пределах  $10 \text{ см}^{-1}$  для обеспечения лучшего качества деконволюции.

#### 4.2.2. Статистический анализ

Статистический анализ был осуществлен при помощи встроенного в MatLab статистического программного пакета (The MathWorks, Natick, MA, США). Для подтверждения статистической разницы между средними значениями спектров КР для контрольных образцов кожи и кожи после воздействия ОПА использовался парный критерий Стьюдента. Далее был применен метод коррекции Бонферони для определения статистической значимости  $p < 0.005$  (обозначена знаком «\*»).

#### 4.3 Результаты и их обсуждение

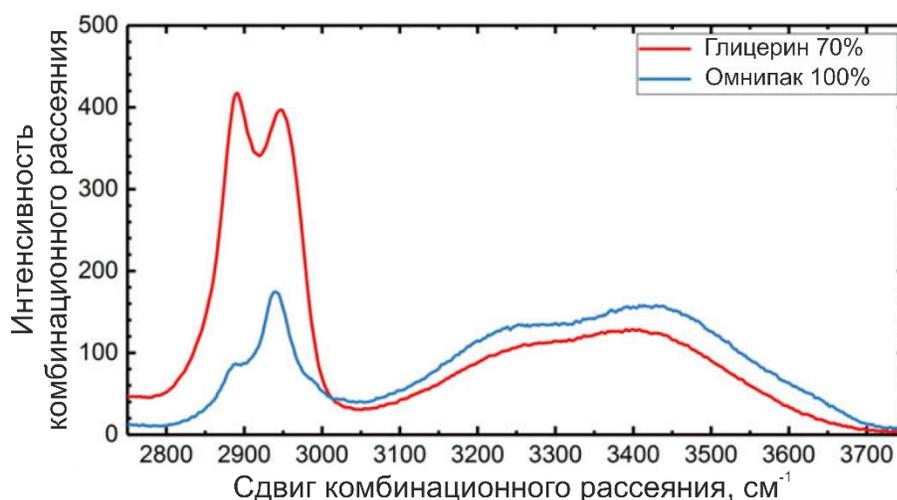


Рисунок 15. Спектры КР 70% раствора глицерина и 100% Омнипак в области больших волновых чисел.

На рисунке 15 представлены спектры КР для Омнипак и глицерина в области больших волновых чисел. Из рисунка видно, что оба ОПА имеют большой сигнал в областях от  $3100\text{ см}^{-1}$  до  $3700\text{ см}^{-1}$  (колебания СО–Н и ОН ОПА) и от  $2910\text{ см}^{-1}$  до  $2965\text{ см}^{-1}$  (колебания СН<sub>2</sub> ОПА). Данные области совпадают с областями соответствующими воде и протеину в коже. В предыдущей главе диссертационной работы было показано, что после 60-ти минутного применения Омнипак проникает на глубину до 40 мкм в кожу, в то время как глицерин проникает на глубину до 160 мкм. Таким образом, характерные линии КР соответствующие ОПА могут потенциально влиять на результаты спектрального анализа кожи.

В таблице 5 представлены нормированные на значения площади под кривой линии протеина значения площадей под кривой для 4 функций Гаусса соответствующих жестко связанной, сильно связанной, слабо связанной и несвязанной воде для различных глубин внутри кожи. Из таблицы видно, что применение обоих ОПА в значительной степени снижает содержание всех четырех типов воды. Тем не менее, эффект оказываемый после применения глицерина в течении 30-ти и 60-ти минут оказался сильнее, чем эффект оказываемый применением Омнипак в течении 60 минут.

В общем и целом, сумма вкладов всех молекулярных типов воды соответствует полному содержанию воды в коже и должна быть равна 100%. Тем не менее, поскольку в данном исследовании проводилось усреднение по множественному числу измерений, сумма всех 4 молекулярных типов воды может отличаться от 100%. Для более ясного представления полученных результатов было рассчитано относительное изменение процентного содержания каждого из типов воды после применения ОПА. Для этого, значения представленные в таблице 5 для контрольных образцов кожи были переведены в процентные значения относительно полного содержания воды. Данные процентные значения были приняты в качестве

контрольных значений. Далее были найдены изменения процентного значения для каждого типа воды относительно контрольных значений после применения ОПА.

Таблица 5. Нормированные на линию протеина значения площадей под кривой для DAA-ОН, DDAА-ОН, DA-ОН, free-ОН и полного содержания воды на различных глубинах внутри кожи. В таблице представлены средние значения  $\pm$ стандартное отклонение. Знаком «\*» обозначена статистическая значимость  $p \leq 0.005$  между контрольными образцами кожи без применения ОПА и образцами кожи после применения ОПА.

DAA-ОН (жестко связанная вода)					
Глубина, мкм	Без ОПА	Омнипак, 30 мин	Омнипак, 60 мин	Глицерин, 30 мин	Глицерин, 60 мин
0	0.14 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
40	0.17 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01*	0.08 $\pm$ 0.01*
80	0.17 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01*
120	0.16 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02*
160	0.16 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01*	0.06 $\pm$ 0.01*
200	0.16 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01*	0.05 $\pm$ 0.01*
DDAA-ОН (сильно связанная вода)					
Глубина, мкм	Без ОПА	Омнипак, 30 мин	Омнипак, 60 мин	Глицерин, 30 мин	Глицерин, 60 мин
0	2.93 $\pm$ 0.24	3.12 $\pm$ 0.21	3.20 $\pm$ 0.24	3.44 $\pm$ 0.25	2.91 $\pm$ 0.24
40	4.79 $\pm$ 0.19	5.08 $\pm$ 0.14	5.26 $\pm$ 0.18	3.49 $\pm$ 0.17*	2.71 $\pm$ 0.18*
80	4.86 $\pm$ 0.14	4.51 $\pm$ 0.18	4.25 $\pm$ 0.18	3.23 $\pm$ 0.16*	2.54 $\pm$ 0.15*
120	4.95 $\pm$ 0.2	4.63 $\pm$ 0.14	4.53 $\pm$ 0.17	3.13 $\pm$ 0.19*	2.19 $\pm$ 0.16*
160	4.88 $\pm$ 0.18	4.75 $\pm$ 0.17	4.27 $\pm$ 0.17	3.40 $\pm$ 0.16*	2.37 $\pm$ 0.16*
200	4.96 $\pm$ 0.29	4.62 $\pm$ 0.25	4.16 $\pm$ 0.24	3.12 $\pm$ 0.27*	2.29 $\pm$ 0.25*
DA-ОН (слабо связанная вода)					
Глубина, мкм	Без ОПА	Омнипак, 30 мин	Омнипак, 60 мин	Глицерин, 30 мин	Глицерин, 60 мин
0	3.37 $\pm$ 0.24	3.55 $\pm$ 0.24	3.66 $\pm$ 0.24	3.65 $\pm$ 0.27	3.33 $\pm$ 0.27
40	5.40 $\pm$ 0.23	5.70 $\pm$ 0.25	6.20 $\pm$ 0.19	4.02 $\pm$ 0.18*	2.99 $\pm$ 0.17*
80	5.59 $\pm$ 0.21	5.23 $\pm$ 0.17	4.95 $\pm$ 0.14	3.76 $\pm$ 0.17*	2.89 $\pm$ 0.16*
120	5.69 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.2	5.25 $\pm$ 0.17	3.65 $\pm$ 0.17*	2.52 $\pm$ 0.2*
160	5.91 $\pm$ 0.17	5.61 $\pm$ 0.2	5.09 $\pm$ 0.21	3.91 $\pm$ 0.20*	2.93 $\pm$ 0.26*
200	6.12 $\pm$ 0.38	5.1 $\pm$ 0.27	5.00 $\pm$ 0.25	3.81 $\pm$ 0.30*	2.79 $\pm$ 0.25*
Free-ОН (несвязанная вода)					
Глубина, мкм	Без ОПА	Омнипак, 30 мин	Омнипак, 60 мин	Глицерин, 30 мин	Глицерин, 60 мин
0	0.32 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.04
40	0.59 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.04*	0.32 $\pm$ 0.04*

80	0.63±0.05	0.60±0.04	0.55±0.04	0.51±0.04*	0.25±0.04*
120	0.59±0.05	0.57±0.04	0.55±0.06	0.48±0.05	0.27±0.05*
160	0.60±0.05	0.57±0.07	0.50±0.05	0.40±0.05*	0.26±0.04*
200	0.62±0.05	0.55±0.05	0.49±0.05	0.40±0.04*	0.25±0.04*
Полное содержание воды					
Глубина, мкм	Без ОПА	Омнипак, 30 мин	Омнипак, 60 мин	Глицерин, 30 мин	Глицерин, 60 мин
0	6.76±0.59	7.22±0.5	7.37±0.58	7.62±0.6	6.68±0.62
40	10.97±0.46	11.52±0.49	12.22±0.43	8.06±0.41*	6.10±0.36*
80	11.26±0.45	10.49±0.45	9.87±0.36	7.50±0.41*	5.74±0.41
120	11.40±0.46	10.75±0.42	10.45±0.46	7.37±0.42*	5.04±0.44*
160	11.55±0.43	11.06±0.47	10.00±0.44	7.82±0.41*	5.53±0.5*
200	11.87±0.74	10.72±0.57	9.78±0.58	7.42±0.6*	5.38±0.58*

На рисунке 16 представлены относительные процентные значения жестко связанной, сильно связанной, слабо связанной и несвязанной воды для контрольных образцов кожи без применения ОПА и для кожи после применения Омнипак и глицерина в течении 30-ти и 60-ти минут. Важно отметить, что сумма процентных значений для кожи после применения ОПА меньше 100%. Это связано с вытеснением воды из кожи за счет дегидратации вызванной применением ОПА.

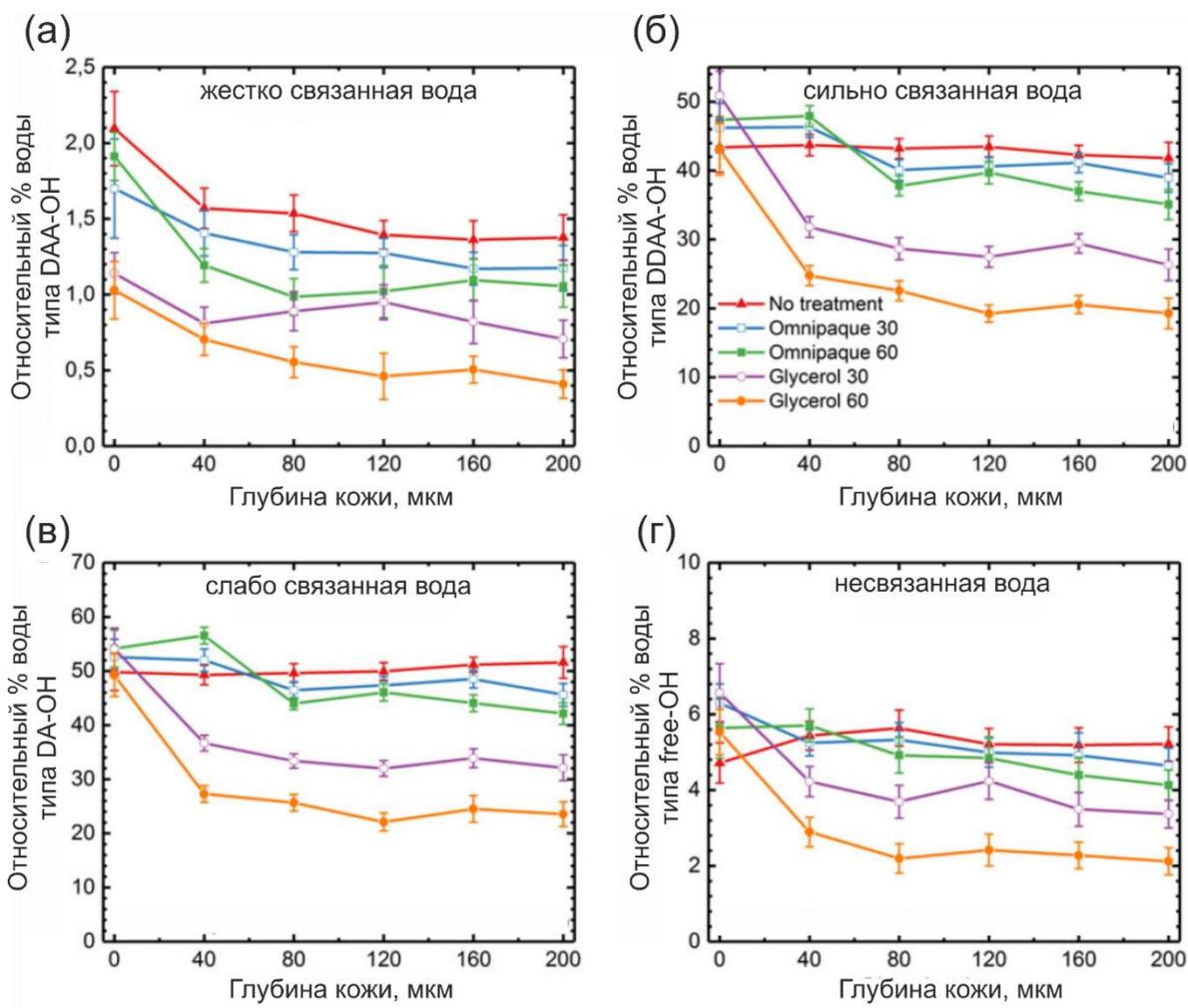


Рисунок 16. Распределение относительных процентных значений DAA-OH (а), DDAA-OH (б), DA-OH (в), free-OH (г) на различных глубинах для контрольных образцов кожи без воздействия ОПА (красная линия), для кожи после воздействия Омнипак в течении 30-ти минут (синяя линия) и 60-ти минут (зеленая линия), для кожи после воздействия глицерином в течении 30-ти минут (фиолетовая линия) и 60-ти минут (оранжевая линия).

Из данных представленных на рисунке 16(а) следует, что процент жестко связанной воды уменьшается на всех глубинах внутри кожи после применения как Омнипак, так и глицерина. Тем не менее, глицерин оказывает значительно большее влияние на содержание воды чем Омнипак.

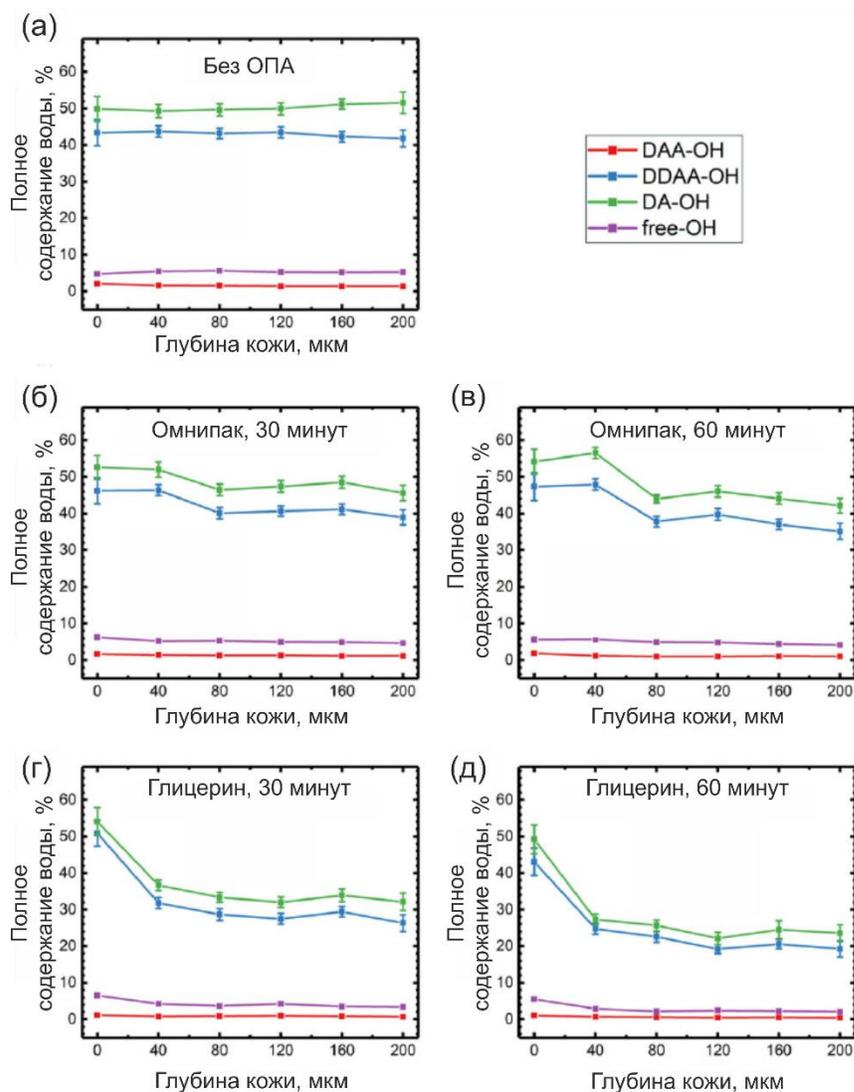


Рисунок 17. Распределение процентных значений DAA-OH (красная линия), DDAA-OH (синяя линия), DA-OH (зеленая линия), free-OH (фиолетовая линия) относительно полного содержания воды на различных глубинах для контрольных образцов кожи без воздействия ОПА (а), для кожи после воздействия Омнипак в течении 30 минут (б) и 60 минут (в), для кожи после воздействия глицерином в течении 30-ти минут (г) и 60-ти минут (д).

По сравнению с другими типами воды, содержание жестко связанной воды претерпевает наименьшие изменения после применения обоих ОПА (максимальная потеря составила 0.47 % после 60 минутного применения глицерина). Также, можно отметить, что для контрольных образцов кожи содержание DAA-OH уменьшалось

на больших глубинах. На рисунке 16(б) показано, что содержание сильно связанной воды практически одинаково для всех исследуемых глубин кожи без ОП и равно 42%-43%. Применение Омнипак в течении 30 минут привело к небольшому изменению содержания сильно связанной воды на глубинах от 80 до 200 мкм, в то время как 60 минутное применение Омнипак значительно снижало содержание воды на этих же глубинах. Также можно заметить, что содержание сильно связанной воды на глубинах от 0 до 40 мкм для образцов кожи после воздействия Омнипак больше чем для контрольных образцов кожи. Это может быть связано с тем, что за 60 минут воздействия агентом Омнипак успевает проникнуть на глубину 35-40 мкм [47]. Таким образом сигнал КР соответствующий содержанию воды в коже накладывается на сигнал КР соответствующий воде в ОПА. Другой причиной данного эффекта может служить неточная процедура нормализации на линию протеина в области 40 мкм (шиповатый слой кожи). Данному слою свойственен дефицит протеинов по сравнению с роговым слоем который богат кератином, а также по сравнению с дермой которая богата коллагеном I, II и эластином [10]. Применение глицерина уменьшило содержание DDAA-ОН даже на глубине 40 мкм. Наибольший эффект был достигнут на глубине 120 мкм после 60-ти минутного воздействия, где содержание сильно связанной воды упало с 43.47% до 19.23%. На рисунке 16 (в) показано, что содержание DA-ОН в контрольных образцах кожи также не имеет значительной разницы для различных глубин. Тем не менее, содержание DA-ОН (50%-51%) несколько выше чем содержание DDAA-ОН (42%-43%). В общих чертах, графики зависимости содержания слабо связанной воды после применения обоих ОПА имеют похожую форму с аналогичными графиками для сильно связанной воды. 60-ти минутное применение Омнипак вызывало уменьшение содержания DA-ОН на глубинах превышающих 80 мкм. Глицерин оказывал более сильное влияние на содержание слабо связанной воды как после 30-ти минутного, так и после 60-ти минутного воздействия. Наибольший эффект был достигнут на глубине 200 мкм после 60-ти минутного воздействия, где содержание

DA-ОН упало с 51.60% до 23.56%. Более того, слабо связанная вода претерпевала наибольшие изменения после применения ОПА по сравнению с другими типами воды. На рисунке 16(г) показано, что 30-ти минутное воздействие Омнипак не вызвало значительного изменения содержания несвязанной воды. Более длительное применение Омнипак привело к небольшому снижению несвязанной воды на глубинах 80 мкм, 160 мкм и 200 мкм. Также как и для других типов воды, применение глицерина оказывало более сильное уменьшение содержания несвязанной воды по сравнению с Омнипак. Максимальный эффект достигался на глубине 200 мкм после 60-ти минутного воздействия глицерином, где содержание несвязанной воды уменьшилось с 5.21% до 2.12%. Значения содержания воды всех типов на поверхности кожи полученные в данном исследовании хорошо совпадают с результатами по исследованию содержания воды в роговом слое свиной кожи опубликованными в работе [224].

На рисунке 17 представлены процентные значения содержания DAA-ОН, DDAA-ОН, DA-ОН и free-ОН относительно полного содержания воды для контрольных образцов кожи без воздействия ОПА и для кожи после воздействия обоими ОПА. Из рисунков видно, что для всех экспериментов сильно связанная и слабо связанная вода составляли большую часть от всего состава воды кожи (около 93%), в то время как жестко связанная и несвязанная вода в сумме имели концентрацию не превышавшую 10%. Данный результат хорошо согласуется с результатами приведенными в работах [224, 277]. Из рисунков 17 (б) и (в) хорошо видно, что применение Омнипак приводило к сильному снижению содержания DDAA-ОН и DA-ОН на глубинах от 80 мкм до 200 мкм. Применение же глицерина оказывало аналогичный эффект на глубинах от 60 мкм до 200 мкм (см. рисунки 17 (г) и (д)). Также, из рисунка 17 можно заметить, что разница между процентными значениями DDAA-ОН и DA-ОН уменьшалась после 60-ти минутного воздействия глицерином, в то время как для контрольных образцов и образцов кожи после

воздействия Омнипак подобного эффекта не наблюдалась. Полученные результаты демонстрируют, что слабосвязанная и сильно связанная вода преимущественно задействованы в оттоке воды из тканей вызванном применением ОПА. Таким образом, эффективность ОП зависит от изменения содержания данных типов воды. Также, эксперимент описанный в данной главе диссертационной работы подтверждают результаты молекулярного моделирования процессов иммерсионного ОП описанных в работе [143]. В данной работе было выдвинуто предположение о том, что одним из механизмов ОП является замещение молекулами ОПА молекул воды биологической ткани связанными с молекулами коллагена.

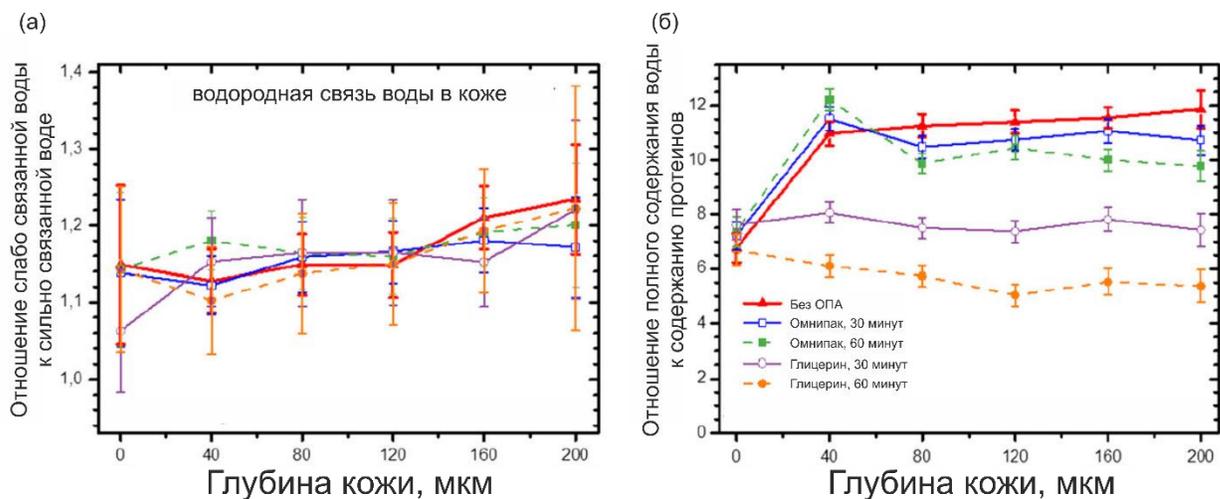


Рисунок 18. Среднее распределение водородной связи молекул воды в зависимости от глубины внутри кожи (а). Среднее распределение полного содержания воды в зависимости от глубины внутри кожи (б). Красная линия соответствует контрольным образцам кожи. Синяя линия соответствует образцам кожи после 30-ти минутного воздействия Омнипак. Зеленая пунктирная линия соответствует образцам кожи после 60-ти минутного воздействия Омнипак. Фиолетовая линия соответствует образцам кожи после 30-ти минутного воздействия глицерина. Оранжевая пунктирная линия соответствует образцам кожи после 60-ти минутного воздействия глицерина.

На рисунке 18 (а) представлена зависимость отношения слабо связанной воды к сильно связанной воде в зависимости от глубины внутри кожи. Данная зависимость отражает водородную связь молекул воды в каждом покрове [277, 284]. Из рисунка видно, что применение обоих ОПА в течении 30-ти и 60-ти минут не вызывает значительного изменения водородной связи молекул воды на всех исследуемых глубинах. Для того, чтобы продемонстрировать влияние ОПА на полный состав воды в коже, было рассчитано полное содержание воды нормированное на линию протеина для различных глубин в коже (см. рисунок 18 (б)). Численные данные также представлены в таблице 5. Полное содержание воды рассчитывалось как сумма областей под кривой для всех четырех типов воды нормированных на линию протеина. Из рисунка 18 (б) видно, что содержание воды в контрольных образцах кожи увеличивается с глубиной, достигая максимального значения на глубине 200 мкм (с разницей в 1.75 раза по сравнению с поверхностным слоем). 30-ти минутное применение Омнипак приводило к небольшому уменьшению содержания воды в коже на глубинах от 80 до 200 мкм. Более длительное воздействие Омнипак оказывало более значительный эффект. Также, можно заметить, что применение Омнипак приводило к увеличению содержания воды на глубинах от 0 мкм до 40 мкм. Данный эффект может быть объяснен наличием ОПА в данных слоях кожи. Из рисунка 18 также видно, что применение глицерина приводит к чрезвычайно сильному уменьшению содержания воды на глубинах от 40 мкм до 200 мкм, что может быть объяснено сильной дегидратацией вызываемой применением глицерина [285]. 60-ти минутное воздействие Омнипак на кожу привело к снижению содержания воды до  $1.21 \pm 0.06$  раз относительно контрольных образцов кожи на глубинах от 80 мкм до 200 мкм, соответственно. В свою очередь, 60-ти минутное воздействие глицерина на кожу привело к снижению содержания воды до  $2.26 \pm 0.05$  раз относительно контрольных образцов кожи на тех же глубинах, соответственно.

Следует учитывать, что полученные результаты могут содержать погрешность в измерении поскольку оба ОПА имели сигнал КР в области соответствующей протеину кожи ( $2910-2965 \text{ см}^{-1}$ ). Основываясь на результатах представленных на рисунке 15, можно заключить, что для глицерина данная погрешность должна быть больше, чем для Омнипак (значение области под кривой для  $2910-2965 \text{ см}^{-1}$  у 70% раствора глицерина в 2.66 раза больше чем у 100% Омнипак). Тем не менее, данная погрешность измерений может значительно влиять на результаты только на глубинах от 0 мкм до 40 мкм, где ОПА обладает наибольшей концентрацией. На больших глубинах линия КР в области  $2910-2965 \text{ см}^{-1}$  для глицерина существенно ниже чем для кожи, что позволяет практически полностью пренебречь оказываемым линией глицерина вкладом.

Важно отметить, что осмотическое давление вызываемое применением глицерина способствует переходу связанной воды в несвязанную [286, 287]. Подобный переход также может быть вызван за счет механического давления [288]. Таким образом, оба этих фактора могут приводить к дегидратации кожи. Также, во время проникновения раствора глицерина в кожный покров, молекулы глицерина связывают молекулы воды ткани, что приводит к обмену между связанной водой в ОПА и водой в коже. Молярная масса Омнипак ( $821 \text{ г/моль}$ ) практически в 10 раз больше молярной массы глицерина ( $82 \text{ г/моль}$ ). Таким образом, диффузия Омнипак в ткань значительно меньше чем у глицерина. В работе [289] было показано, что 40% раствор глицерина вызывает более интенсивный отток воды из рогового слоя, чем более слабые концентрации ОПА. В работе [290] было показано, что содержание воды в ОПА имеет большое влияние на отток воды в тканях при ОП. Отток воды при ОП минимален или даже равен нулю при условии когда концентрация воды в ОПА и концентрация потенциально мобильной воды в ткани одинаковы. В работе [136] было показано, что 60% и 70% растворы имеют наименьший коэффициент диффузии, потому что в процессе диффузии участвуют

только молекулы глицерина. В нашем исследовании самым мобильным типом воды была слабо связанная вода (приблизительно 55% от полного содержания воды). Таким образом, данный тип воды был больше других задействован при оттоке воды из ткани вызванном ОП. Сильно связанная вода также активно участвовала в оттоке из кожи при ОП, но она обладала меньшей мобильностью (приблизительно 44% от полного содержания воды). Данный результат хорошо согласуется с результатами приведенными в работах [136, 286, 291].

Важно отметить, что *in vivo* применение гиперосмотических агентов способно вызвать сильную дегидратацию поверхностного слоя кожи за короткое время (10-20 минут) [292, 293] За это время агенты проникают в эпидермис. Дальнейшее проникновение агентов в кожу провоцирует расширение микрососудов и последующую диффузию воды из этих микрососудов в дерму и эпидермис [294] Для глицерина механизм данного взаимодействия заключается в том, что молекулы глицерина выступают в качестве увлажнителя привлекающие к себе воду до тех пор, пока вода не достигнет концентрации 55% [295].

#### **4.4 Выводы**

В данной главе диссертационной работы были представлены результаты изучения влияния 100% Омнипак и 70% раствора глицерина на полное содержание воды в коже, а также на различные типы воды в зависимости от силы ее водородной связи (жестко связанная, сильно связанная, слабо связанная и несвязанная вода). Было показано, что воздействие Омнипак в течении 30-ти минут не вызывает значительных изменений в полном содержании воды. Была зафиксирована лишь небольшая тенденция к уменьшению на 4.4%. Дальнейшее воздействие Омнипак привело к уменьшению полного содержания воды на 8.3% на глубинах от 80 мкм до 200мкм, что связано со значительным уменьшением содержания жестко связанной (уменьшение на 26.1%), сильно связанной (уменьшение на 7.9%) и слабосвязанной (уменьшение на 7.5%) воды. На глубине 40 мкм было отмечено увеличение

содержания воды после применения Омнипак на 5.0% и 11.4% в течении 30 и 60 минут, соответственно. Применение 70% раствора глицерина в течении 30 и 60 минут приводило к сильному уменьшению содержания воды на глубинах от 40 до 200 мкм (уменьшение на 33.1% и 51.3% соответственно). Уменьшение содержания для каждого из типов воды после 30 и 60 минутного применения раствора глицерина было следующим: сильно связанная вода – 33.2% и 50.4%, слабо связанная вода – 33.2% и 51.1%, жестко связанная вода – 42.3% и 63.6 %, несвязанная вода – 28.7% и 55.4%.

Поскольку слабо связанная и сильно связанная вода составляет около 93% от полного состава воды в коже, данные типы воды наиболее вовлечены во взаимодействии с ОПА. В тоже время, несвязанная вода, являющаяся наиболее мобильным типом воды в коже, также вовлечена в оттоке воды вызванным применением ОПА.

Согласно исследованиям приведенным в данной главе диссертационной работы, а также исследованиям описанным в предыдущих главах, можно предположить что эффективность ОП напрямую связана с одним из ключевых механизмов ОП (дегидратация) и зависит от количества уменьшения содержания воды за счет применения ОПА. Тем не менее, длительное применение ОПА может оказывать негативные эффекты на живые ткани. Таким образом, при клинических *in vivo* измерениях нужно учитывать баланс между эффективностью ОПА и безопасностью его применения.

## Заключение

В данной диссертационной работе при помощи методов МФТ и СКР было изучено влияние, оказываемое местным применением ОПА с различной осмолярностью на свиную кожу *ex vivo*.

Было проведено сравнение воздействия растворов глицерина и йогексола (Омнипак-300) на сигналы АФ и ГВГ на различных глубинах в коже. Омнипак-300 был впервые использован для МФТ измерений. Было показано, что применение обоих ОПА позволяет значительно увеличить глубину зондирования при МФТ измерениях, а также улучшить контраст и качество получаемых изображений. Было показано, что 60-ти минутное местное применение Омнипак-300 вызывает увеличение сигнала автофлуоресценции до  $1.50 \pm 0.05$  раза, сигнала генерации второй гармоники до  $3.00 \pm 0.03$  раз. В тоже время, Омнипак-300 не оказывал какого-либо видимого воздействия на морфологию ткани в отличие от глицерина.

Также были показаны результаты изучения изменений спектров КР свиной кожи, вызванных применением ОПА. Эффективность воздействия глицерина и Омнипак-300 были сравнены с контрольными образцами кожи (без воздействия ОПА). Результаты исследований показали, что интенсивность КР линий, типичных для кожи существенно увеличивалась на глубинах, превышающих 40 мкм, после применения глицерина, и на глубинах превышающих 160 мкм, после применения Омнипак-300. В частности, было показано, что 60-ти минутное местное применение Омнипак-300 вызывает увеличение интенсивности характерных молекулярных линий спектра КР на  $937 \text{ см}^{-1}$ ,  $1003 \text{ см}^{-1}$ ,  $1244 \text{ см}^{-1}$ ,  $1272 \text{ см}^{-1}$ ,  $1426 \text{ см}^{-1}$  и  $1665 \text{ см}^{-1}$  до  $1.40 \pm 0.03$ ,  $1.43 \pm 0.04$ ,  $1.45 \pm 0.04$ ,  $1.52 \pm 0.05$ ,  $1.44 \pm 0.03$  и  $1.51 \pm 0.04$  раз, соответственно.

Было изучено влияние ОПА с различной осмолярностью на гидратацию коллагена. Результаты показали, что Омнипак-300 вызывает меньшую

дегидратацию коллагена (не более  $1.18 \pm 0.09$  раза) по сравнению с действием глицерина (не более  $1.66 \pm 0.07$  раза). Изучение воздействия Омнипак-300 на гидратацию коллагена методом спектроскопии КР было осуществлено впервые.

Было изучено влияние двух типов ОПА различной осмолярности (глицерин и Омнипак-300) на полное содержание воды в коже, а также на содержание различных компонентов воды в зависимости от силы ее водородной связи (жестко связанная, сильно связанная, слабо связанная и несвязанная вода), при местном применении агентов. Результаты показали, что Омнипак-300 вызывает меньшую дегидратацию всей кожной ткани (не более  $1.21 \pm 0.06$  раза) по сравнению с действием глицерина (не более  $2.26 \pm 0.05$  раза).

Было выдвинуто предположение, что поскольку слабо связанная и сильно связанная вода составляет около 93% от полного состава воды в коже, данные типы воды в наибольшей степени вовлечены во взаимодействие с ОПА. Таким образом, эффективность ОП напрямую связана с одним из ключевых механизмов ОП (дегидратацией) и зависит от степени уменьшения содержания воды при действии ОПА, что надежно регистрируется с помощью конфокальной КР спектроскопии.

Впервые было показано воздействие ОПА с разной осмолярностью на различные типы воды в зависимости от силы ее водородной связи.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю профессору и заведующему кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского, д.ф.-м.н., профессору Валерию Викторовичу Тучину за всестороннюю помощь, советы, помощь в обсуждении полученных данных и поддержку при выполнении данной работы; доктору кафедры дерматологии, венерологии и аллергологии медицинского университета Шаритэ, к.ф.-м.н. Максиму Евгеньевичу Дарвину за поддержку и советы по выполнению экспериментов. Автор выражает благодарность профессору кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского, д.ф.-м.н. Березину

Кириллу Валентиновичу, а также доценту кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского, к.ф.-м.н. Башкатову Алексею Николаевичу за рекомендации по оформлению диссертационной работы. Кроме того, автор благодарит всех сотрудников кафедры оптики и биофотоники СГУ им. Н.Г. Чернышевского за разностороннюю помощь при выполнении работы, а также семью и близких за терпение и понимание.

## Список литературы:

1. *Agache P., Humbert P.* Measuring the skin — Springer Science & Business Media, 2004.
2. *Potts R.* Skin barrier: principles of percutaneous absorption // *Archives of Dermatology*. — 1997. — V.133, № 7. — P. 924.
3. *Yokota M., Tokudome Y.* The effect of glycation on epidermal lipid content, its metabolism and change in barrier function // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2016. — V.29, № 5. — P. 231–242.
4. *Proksch E., Brandner J. M., Jensen J.* The skin: an indispensable barrier // *Experimental Dermatology*. — 2008. — V.17, № 12. — P. 1063–1072.
5. *Smeden J. van, Janssens M., Kaye E. C. J., Caspers P. J., Lavrijsen A. P., Vreeken R. J., Bouwstra J. A.* The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients // *Experimental Dermatology*. — 2014. — V.23, № 1. — P. 45–52.
6. *Kalchenko V., Meglinski I., Sdobnov A., Kuznetsov Y., Harmelin A.* Combined laser speckle imaging and fluorescent intravital microscopy for monitoring acute vascular permeability reaction // *Journal of Biomedical Optics*. — 2019. — V.24, № 06. — P. 060501.
7. *Sdobnov A., Bykov A., Molodij G., Kalchenko V., Jarvinen T., Popov A., Kordas K., Meglinski I.* Speckle dynamics under ergodicity breaking // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2018. — V.51, № 15. — P. 155401.
8. *Koenig K., Riemann I.* High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution // *Journal of Biomedical Optics*. — 2003. — V.8, № 3. — P. 432–439.

9. Balu M., Mikami H., Hou J., Potma E. O., Tromberg B. J. Rapid mesoscale multiphoton microscopy of human skin // *Biomedical Optics Express*. — 2016. — V.7, № 11. — P. 4375–4387.
10. Shirshin E. A., Gurfinkel Y. I., Priezzhev A. V, Fadeev V. V, Lademann J., Darvin M. E. Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization // *Scientific Reports*. — 2017. — V.7, № 1. — P. 1–10.
11. Shirshin E. A., Gurfinkel Y. I., Matskeplishvili S. T., Sasonko M. L., Omelyanenko N. P., Yakimov B. P., Lademann J., Darvin M. E. In vivo optical imaging of the viable epidermis around the nailfold capillaries for the assessment of heart failure severity in humans // *Journal of Biophotonics*. — 2018. — V.11, № 9. — P. e201800066.
12. Fercher A. F. Optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. — 1996. — V.1, № 2. — P. 157–174.
13. Gambichler T., Pljakic A., Schmitz L. Recent advances in clinical application of optical coherence tomography of human skin // *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. — 2015. — V.8,. — P. 345.
14. Ferulova I., Lihachev A., Spigulis J. Photobleaching effects on in vivo skin autofluorescence lifetime // *Journal of Biomedical Optics*. — 2015. — V.20, № 5. — P. 51031.
15. Maciel V. H., Correr W. R., Kurachi C., Bagnato V. S., Silva Souza C. Fluorescence spectroscopy as a tool to in vivo discrimination of distinctive skin disorders // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. — 2017. — V.19,. — P. 45–50.
16. Lademann J., Otberg N., Richter H., Meyer L., Audring H., Teichmann A., Thomas S., Knüttel A., Sterry W. Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with

histological analysis // *Skin Research and Technology*. — 2007. — V.13, № 2. — P. 119–132.

17. Ulrich M., Klemp M., Darvin M. E., König K., Lademann J. M., Meinke M. C. In vivo detection of basal cell carcinoma: comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — V.18, № 6. — P. 61229.

18. Дарвин М. Е., Рухтер Х., Жу И. Д., Майнке М. К., Кнорр Ф., Гончуков С. А., Кёнинг К., Ладеман Ю. Сравнение возможностей лазерной сканирующей микроскопии и многофотонной томографии для визуализации кожи человека in vivo и свиной кожи ex vivo // *Квантовая Электроника*. — 2014. — V.44, № 7. — P. 646–651.

19. Darvin M. E., Gersonde I., Albrecht H., Gonchukov S. A., Sterry W. Determination of beta carotene and lycopene concentrations in human skin using resonance Raman spectroscopy // *Laser Physics*. — 2005. — V.15, № 2. — P. 295–299.

20. Vyumvuhore R., Tfayli A. M., Piot O., Guillou M. Le, Guichard N., Manfait M., Baillet-Guffroy A. Raman spectroscopy: in vivo quick response code of skin physiological status // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.19, № 11. — P. 111603.

21. Krafft C., Popp J. The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2015. — V.407, № 3. — P. 699–717.

22. Choe C., Lademann J., Darvin M. E. A depth-dependent profile of the lipid conformation and lateral packing order of the stratum corneum in vivo measured using Raman microscopy // *Analyst*. — 2016. — V.141, № 6. — P. 1981–1987.

23. Darvin M. E., Sterry W., Lademann J., Vergou T. The role of carotenoids in human skin // *Molecules*. — 2011. — V.16, № 12. — P. 10491–10506.

24. Martí-Bonmatí L., Sopena R., Bartumeus P., Sopena P. Multimodality imaging

- techniques // *Contrast Media & Molecular Imaging*. — 2010. — V.5, № 4. — P. 180–189.
25. Koenig K., Speicher M., Bückle R., Reckfort J., McKenzie G., Welzel J., Koehler M. J., Elsner P., Kaatz M. Clinical optical coherence tomography combined with multiphoton tomography of patients with skin diseases // *Journal of Biophotonics*. — 2009. — V.2, № 6-7. — P. 389–397.
26. Chen Z., Rank E., Meiburger K. M., Sinz C., Hodul A., Zhang E., Hoover E., Minneman M., Ensher J., Beard P. C. Non-invasive multimodal optical coherence and photoacoustic tomography for human skin imaging // *Scientific Reports*. — 2017. — V.7, № 1. — P. 1–11.
27. Fan B., Neel V. A., Yaroslavsky A. N. Multimodal imaging for nonmelanoma skin cancer margin delineation // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2017. — V.49, № 3. — P. 319–326.
28. Peng T., Xie H., Ding Y., Wang W., Li Z., Jin D., Tang Y., Ren Q., Xi P. CRAFT: Multimodality confocal skin imaging for early cancer diagnosis // *Journal of Biophotonics*. — 2012. — V.5, № 5-6. — P. 469–476.
29. König K., Raphael A. P., Lin L., Grice J. E., Soyer H. P., Breunig H. G., Roberts M. S., Prow T. W. Applications of multiphoton tomographs and femtosecond laser nanoprocessing microscopes in drug delivery research // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2011. — V.63, № 4–5. — P. 388–404.
30. Patalay R., Talbot C., Alexandrov Y., Munro I., Neil M. A. A., König K., French P. M. W., Chu A., Stamp G. W., Dunsby C. Quantification of cellular autofluorescence of human skin using multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging in two spectral detection channels // *Biomedical Optics Express*. — 2011. — V.2, № 12. — P. 3295–3308.
31. Darvin M. E., König K., Kellner-Hoefer M., Breunig H. G., Werncke W., Meinke M.

- C., Patzelt A., Sterry W., Lademann J. Safety assessment by multiphoton fluorescence/second harmonic generation/hyper-Rayleigh scattering tomography of ZnO nanoparticles used in cosmetic products // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2012. — V.25, № 4. — P. 219–226.
32. Sanchez W. Y., Obispo C., Ryan E., Grice J., Roberts M. S. Changes in the redox state and endogenous fluorescence of in vivo human skin due to intrinsic and photo-aging, measured by multiphoton tomography with fluorescence lifetime imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.18, № 6. — P. 61217.
33. Breunig H. G., Weinigel M., Bückle R., Kellner-Höfer M., Lademann J., Darvin M. E., Sterry W., König K. Clinical coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton tomography of human skin with a femtosecond laser and photonic crystal fiber // *Laser Physics Letters*. — 2013. — V.10, № 2. — P. 25604.
34. Tuchin V. V. Tissue optics. — Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2015.
35. Tuchin V. V., Maksimova I. L., Zimnyakov D. A., Kon I. L., Mavlyutov A. H., Mishin A. A. Light propagation in tissues with controlled optical properties // *Journal of Biomedical Optics*. — 1997. — V.2, № 4. — P. 401–418.
36. Tuchin V. V. Optical clearing of tissues and blood. — CCH, 2006.
37. Sdobnov A. Y., Darvin M. E., Genina E. A., Bashkatov A. N., Lademann J., Tuchin V. V. Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 2018. — V.197,. — P. 216–229.
38. Jiang J., Boese M., Turner P. H., Wang R. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. —

V.13, № 2. — P. 21105.

39. Ларин К. В., Тучин В. В. Функциональная визуализация и оценка скорости диффузии глюкозы в эпителиальных тканях с помощью оптической когерентной томографии // *Квантовая Электроника*. — 2008. — V.38, № 6. — P. 551–556.
40. Tuchina D. K., Shi R., Bashkatov A. N., Genina E. A., Zhu D., Luo Q., Tuchin V. V. Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin // *Journal of Biophotonics*. — 2015. — V.8, № 4. — P. 332–346.
41. Bui A. K., McClure R. A., Chang J., Stoianovici C., Hirshburg J., Yeh A. T., Choi B. Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO) // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2009. — V.41, № 2. — P. 142–148.
42. Tuchin V. V., Xu X., Wang R. K. Dynamic optical coherence tomography in studies of optical clearing, sedimentation, and aggregation of immersed blood // *Applied Optics*. — 2002. — V.41, № 1. — P. 258–271.
43. Bykov A., Hautala T., Kinnunen M., Popov A., Karhula S., Saarakkala S., Nieminen M. T., Tuchin V., Meglinski I. Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage // *Journal of Biophotonics*. — 2016. — V.9, № 3. — P. 270–275.
44. Cicchi R., Pavone F. S., Massi D., Sampson D. D. Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents // *Optics Express*. — 2005. — V.13, № 7. — P. 2337–2344.
45. Sdobnov A., Darvin M. E., Lademann J., Tuchin V. A comparative study of ex vivo skin optical clearing using two-photon microscopy // *Journal of Biophotonics*. — 2017. — V.10, № 9. — P. 1115–1123.
46. Schulmerich M. V., Cole J. H., Dooley K. A., Morris M. D., Kreider J., Goldstein S. A. Optical clearing in transcutaneous Raman spectroscopy of murine cortical bone tissue //

*Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 2. — P. 21108.

47. Sdobnov A. Y., Tuchin V. V., Lademann J., Darvin M. E. Confocal Raman microscopy supported by optical clearing treatment of the skin—influence on collagen hydration // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2017. — V.50, № 28. — P. 285401.

48. Sdobnov A. Y., Darvin M. E., Schleusener J., Lademann J., Tuchin V. V. Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy // *Journal of Biophotonics*. — 2019. — V.12, № 5. — P. e201800283.

49. Liopo A. V, Su R., Tsyboulski D. A., Oraevsky A. A. Optical clearing of skin enhanced with hyaluronic acid for increased contrast of optoacoustic imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — V.21, № 8. — P. 81208.

50. Liu Y., Yang X., Zhu D., Shi R., Luo Q. Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime // *Optics Letters*. — 2013. — V.38, № 20. — P. 4236–4239.

51. Zhao Q., Li L., Li Q., Jiang X., Ren Q., Zhou C. Concentration dependence of optical clearing on the enhancement of laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.19, № 3. — P. 36019.

52. Zhou Y., Yao J., Wang L. V. Optical clearing-aided photoacoustic microscopy with enhanced resolution and imaging depth // *Optics Letters*. — 2013. — V.38, № 14. — P. 2592–2595.

53. Yang X., Liu Y., Zhu D., Shi R., Luo Q. Dynamic monitoring of optical clearing of skin using photoacoustic microscopy and ultrasonography // *Optics Express*. — 2014. — V.22, № 1. — P. 1094–1104.

54. Yang X., Zhang Y., Zhao K., Zhao Y., Liu Y., Gong H., Luo Q., Zhu D. Skull optical clearing solution for enhancing ultrasonic and photoacoustic imaging // *IEEE Transactions*

- on Medical Imaging*. — 2016. — V.35, № 8. — P. 1903–1906.
55. *Menyaev Y. A., Nedosekin D. A., Sarimollaoglu M., Juratli M. A., Galanzha E. I., Tuchin V. V., Zharov V. P.* Optical clearing in photoacoustic flow cytometry // *Biomedical Optics Express*. — 2013. — V.4, № 12. — P. 3030–3041.
56. *Тучин В. В.* Оптика биологических тканей.— М.: Физматлит, 2013.
57. *Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф.* Биологическая химияю — М.: Медицина, 1990.
58. *Igarashi T., Nishino K., Nayar S. K.* The appearance of human skin: A survey // *Foundations and Trends® in Computer Graphics and Vision*. — 2007. — V.3, № 1. — P. 1–95.
59. *Чернух А. М., Фролов Е. П.* Кожа (строение, функция, общая патология и терапия) — М.: Медицина, 1982.
60. *Quondamatteo F.* Skin and diabetes mellitus: what do we know? // *Cell and Tissue Research*. — 2014. — V.355, № 1. — P. 1–21.
61. *Simpson C. L., Patel D. M., Green K. J.* Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2011. — V.12, № 9. — P. 565–580.
62. *Farage M. A., Miller K. W., Elsner P., Maibach H. I.* Structural characteristics of the aging skin: a review // *Cutaneous and Ocular Toxicology*. — 2007. — V.26, № 4. — P. 343–357.
63. *Федюкович Н. И.* Анатомия и физиология человека. — Феникс, 2003.
64. *Страйер Л.* Биохимия. — Рипол Классик, 1985.
65. *Glanze W. D., Anderson K., Anderson L. E.* Mosby’s medical, nursing, and allied health dictionary. — Mosby, 1990.
66. *O’Rahilly R., Müller F.* Basic human anatomy: a regional study of human structure. —

WB Saunders Company, 1983.

67. Gniadecka M., Wessel S., Heidenheim M., Wulf H. C., Nielsen O. F., Christensen D. H. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin // *Journal of Investigative Dermatology*. — 1998. — V.111, № 6. — P. 1129–1133.
68. Visscher M. O., Tolia G. T., Wickett R. R., Hoath S. B. Effect of soaking and natural moisturizing factor on stratum corneum water-handling properties // *Journal of Cosmetic Science*. — 2003. — V.54, № 3. — P. 289–300.
69. Egawa M., Yanai M., Maruyama N., Fukaya Y., Hirao T. Visualization of water distribution in the facial epidermal layers of skin using high-sensitivity near-infrared (nir) imaging // *Applied Spectroscopy*. — 2015. — V.69, № 4. — P. 481–487.
70. Lademann J., Vergou T., Darvin M. E., Patzelt A., Meinke M. C., Voit C., Papakostas D., Zastrow L., Sterry W., Doucet O. Influence of topical, systemic and combined application of antioxidants on the barrier properties of the human skin // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2016. — V.29, № 1. — P. 41–46.
71. Ascencio S. M., Choe C., Meinke M. C., Müller R. H., Maksimov G. V, Wigger-Alberti W., Lademann J., Darvin M. E. Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin ex vivo // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. — 2016. — V.104,. — P. 51–58.
72. Bouwstra J. A., Graaff A. de, Gooris G. S., Nijssse J., Wiechers J. W., Aelst A. C. van. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2003. — V.120, № 5. — P. 750–758.
73. Vyumvuhore R., Tfayli A., Duplan H., Delalleau A., Manfait M., Baillet-Guffroy A. Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular

level: ex vivo Raman spectroscopy analysis // *Analyst*. — 2013. — V.138, № 14. — P. 4103–4111.

74. *Norlen L.* Current understanding of skin barrier morphology // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2013. — V.26, № 4–6. — P. 213–216.

75. *Logtestijn M. D. A. van, Domínguez-Hüttinger E., Stamatas G. N., Tanaka R. J.* Resistance to water diffusion in the stratum corneum is depth-dependent // *PloS One*. — 2015. — V.10, № 2.

76. *Oliveira L. M., Carvalho M. I., Nogueira E. M., Tuchin V. V.* The characteristic time of glucose diffusion measured for muscle tissue at optical clearing // *Laser Physics*. — 2013. — V.23, № 7. — P. 75606.

77. *Oliveira L., Carvalho M. I., Nogueira E., Tuchin V. V.* Optical measurements of rat muscle samples under treatment with ethylene glycol and glucose // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2013. — V.6, № 02. — P. 1350012.

78. *Imokawa G., Abe A., Jin K., Higaki Y., Kawashima M., Hidano A.* Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? // *Journal of Investigative Dermatology*. — 1991. — V.96, № 4. — P. 523–526.

79. *Boireau-Adamezyk E., Baillet-Guffroy A., Stamatas G. N.* Mobility of water molecules in the stratum corneum: effects of age and chronic exposure to the environment. // *The Journal of Investigative Dermatology*. — 2014. — V.134, № 7. — P. 2046–2049.

80. *Alonso A., Meirelles N. C., Tabak M.* Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. — 1995. — V.1237, № 1. — P. 6–15.

81. *Vyumvuhore R., Tfayli A., Biniek K., Duplan H., Delalleau A., Manfait M., Dauskardt R., Baillet-Guffroy A.* The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo // *Journal of Biophotonics*. —

2015. — V.8, № 3. — P. 217–225.

82. Chung S. H., Cerussi A. E., Merritt S. I., Ruth J., Tromberg B. J. Non-invasive tissue temperature measurements based on quantitative diffuse optical spectroscopy (DOS) of water // *Physics in Medicine & Biology*. — 2010. — V.55, № 13. — P. 3753.

83. Martin K. A. Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy // *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. — 1993. — V.44,. — P. 249.

84. Arimoto H., Egawa M. Non-contact skin moisture measurement based on near-infrared spectroscopy // *Applied Spectroscopy*. — 2004. — V.58, № 12. — P. 1439–1446.

85. Anderson R. R., Parrish J. A. Optical properties of human skin. — Springer,— 1982. — P. 147–194.

86. Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Tuchin V. V. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2005. — V.38, № 15. — P. 2543.

87. Troy T. L., Thennadil S. N. Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm // *Journal of Biomedical Optics*. — 2001. — V.6, № 2. — P. 167–177.

88. Berg J., Tymoczko J., Stryer L. Biochemistry (Loose-Leaf). — Macmillan, 2008. — P. 183–194.

89. Zonios G., Dimou A., Bassukas I., Galaris D., Tsolakidis A., Kaxiras E. Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 1. — P. 14017.

90. Riesz J. J. The spectroscopic properties of melanin. — University of Queensland, 2007.

91. Meredith P., Powell B. J., Riesz J., Nighswander-Rempel S. P., Pederson M. R., Moore

- E. G.* Towards structure–property–function relationships for eumelanin // *Soft Matter*. — 2006. — V.2, № 1. — P. 37–44.
92. *Kaxiras E., Tsolakidis A., Zonios G., Meng S.* Structural model of eumelanin // *Physical Review Letters*. — 2006. — V.97, № 21. — P. 218102.
93. *Doi M., Tominaga S.* Spectral estimation of human skin color using the Kubelka-Munk theory. — International Society for Optics and Photonics, 2003. — P. 221–228.
94. *Dawson J. B., Barker D. J., Ellis D. J., Cotterill J. A., Grassam E., Fisher G. W., Feather J. W.* A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin // *Physics in Medicine & Biology*. — 1980. — V.25, № 4. — P. 695.
95. *Stam B., Gemert M. J. C. Van, Leeuwen T. G. Van, Aalders M. C. G.* 3D finite compartment modeling of formation and healing of bruises may identify methods for age determination of bruises // *Medical & biological engineering & computing*. — 2010. — V.48, № 9. — P. 911–921.
96. *Randeberg L. L., Haugen O. A., Haaverstad R., Svaasand L. O.* A novel approach to age determination of traumatic injuries by reflectance spectroscopy // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2006. — V.38, № 4. — P. 277–289.
97. *Andree S., Helfmann J., Gersonde I.* Determination of chromophore concentrations from spatially resolved skin measurements. — Optical Society of America, 2011. — p. 808716.
98. *Svaasand L. O., Norvang L. T., Fiskerstrand E. J., Stopps E. K. S., Berns M. W., Nelson J. S.* Tissue parameters determining the visual appearance of normal skin and port-wine stains // *Lasers in Medical Science*. — 1995. — V.10, № 1. — P. 55–65.
99. *Verkruysse W., Zhang R., Choi B., Lucassen G., Svaasand L. O., Nelson J. S.* A library based fitting method for visual reflectance spectroscopy of human skin // *Physics in Medicine & Biology*. — 2004. — V.50, № 1. — P. 57.

100. *Tuchin V. V.* Handbook of optical sensing of glucose in biological fluids and tissues. — CRC press, 2008.
101. *Zhu D., Larin K. V., Luo Q., Tuchin V. V.* Recent progress in tissue optical clearing // *Laser & Photonics Reviews*. — 2013. — V.7, № 5. — P. 732–757.
102. *Anderson R. R., Parrish J. A.* The optics of human skin. // *Journal of Investigative Dermatology*. — 1981. — V.77, № 1. — P. 13–19.
103. *Takiwaki H.* Measurement of skin color: practical application and theoretical considerations // *Journal of Medical Investigation*. — 1998. — V.44,. — P. 121–126.
104. *McGrath J. A., Eady R. A. J., Pope F. M.* Anatomy and organization of human skin // *Rook's textbook of dermatology*. — 2004. — V.10,. — P. 9781444317633.
105. *Mourant J. R., Freyer J. P., Hielscher A. H., Eick A. A., Shen D., Johnson T. M.* Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to noninvasive optical-tissue diagnostics // *Applied Optics*. — 1998. — V.37, № 16. — P. 3586–3593.
106. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Stolnitz M. M., Bashkatova T. A., Novikova O. V., Peshkova A. Y., Tuchin V. V.* Optical properties of melanin in the skin and skinlike phantoms. — International Society for Optics and Photonics, 2000. — P. 219–226.
107. *Salomatina E. V., Jiang B., Novak J., Yaroslavsky A. N.* Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V.11, № 6. — P. 64026.
108. *Tuchin V. V., Wang L., Zimnyakov D. A.* Optical polarization in biomedical applications. — Springer Science & Business Media, 2006.
109. *Leonard D. W., Meek K. M.* Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma // *Biophysical Journal*. — 1997. — V.72, № 3. — P. 1382–1387.

110. *Drexler W., Fujimoto J. G.* Optical coherence tomography: technology and applications. — Springer Science & Business Media, 2008.
111. *Friebel M., Meinke M.* Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250-1100 nm dependent on concentration // *Applied Optics*. — 2006. — V.45, № 12. — P. 2838–2842.
112. *Lazareva E. N., Tuchin V. V.* Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range // *Journal of Biomedical Optics*. — 2018. — V.23, № 3. — P. 35004.
113. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Tuchin V. V.* Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2011. — V.4, № 01. — P. 9–38.
114. *Patwardhan S. V., Dhawan A. P., Relue P. A.* Monte Carlo simulation of light-tissue interaction: three-dimensional simulation for trans-illumination-based imaging of skin lesions // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. — 2005. — V.52, № 7. — P. 1227–1236.
115. *Gemert M. J. C. Van, Jacques S. L., Sterenborg H., Star W. M.* Skin optics // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. — 1989. — V.36, № 12. — P. 1146–1154.
116. *Jacques S. L., Alter C. A., Prahl S. A.* Angular dependence of HeNe laser light scattering by human dermis // *Lasers in the Life Science*. — 1987. — V.1, № 4. — P. 309–333.
117. *Bruls W. A. G., Leun J. C. Van Der* Forward scattering properties of human epidermal layers // *Photochemistry and Photobiology*. — 1984. — V.40, № 2. — P. 231–242.
118. *Prahl S. A.* Light transport in tissue (Ph. D. Thesis). — Austin: University of Texas at Austin, 1988.
119. *Jacques S. L.* The role of skin optics in diagnostic and therapeutic uses of lasers. —

Springer, 1991. — P. 1–21.

120. *Beek J. F., Blokland P., Posthumus P., Aalders M., Pickering J. W., Sterenborg H., Gemert M. J. C. Van* In vitro double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm // *Physics in Medicine & Biology*. — 1997. — V.42, № 11. — P. 2255.

121. *Du Y., Hu X. H., Cariveau M., Ma X., Kalmus G. W., Lu J. Q.* Optical properties of porcine skin dermis between 900 nm and 1500 nm // *Physics in Medicine & Biology*. — 2001. — V.46, № 1. — P. 167.

122. *Ma X., Lu J. Q., Ding H., Hu X.-H.* Bulk optical parameters of porcine skin dermis at eight wavelengths from 325 to 1557 nm // *Optics Letters*. — 2005. — V.30, № 4. — P. 412–414.

123. *Duck F. A.* Physical properties of tissues: a comprehensive reference book. — Academic press, 2013.

124. *Tearney G. J., Brezinski M. E., Southern J. F., Bouma B. E., Hee M. R., Fujimoto J. G.* Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography // *Optics Letters*. — 1995. — V.20, № 21. — P. 2258–2260.

125. *Knuettel A. R., Boehlau-Godau M.* Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. — 2000. — V.5, № 1. — P. 83–93.

126. *Alexandrov S. A., Zvyagin A. V., Silva K. D., Sampson D. D.* Bifocal optical coherence refractometry of turbid media // *Optics Letters*. — 2003. — V.28, № 2. — P. 117–119.

127. *Zvyagin A. V., Silva K. D., Alexandrov S. A., Hillman T. R., Armstrong J. J., Tsuzuki T., Sampson D. D.* Refractive index tomography of turbid media by bifocal optical coherence refractometry // *Optics Express*. — 2003. — V.11, № 25. — P. 3503–3517.

128. *Ding H., Lu J. Q., Wooden W. A., Kragel P. J., Hu X.-H.* Refractive indices of human

skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm // *Physics in Medicine & Biology*. — 2006. — V.51, № 6. — P. 1479.

129. Sand M., Gambichler T., Moussa G., Bechara F. G., Sand D., Altmeyer P., Hoffmann K. Evaluation of the epidermal refractive index measured by optical coherence tomography // *Skin Research and Technology*. — 2006. — V.12, № 2. — P. 114–118.

130. Knuettel A. R., Bonev S. M., Knaak W. New method for evaluation of in vivo scattering and refractive index properties obtained with optical coherence tomography // *Journal of Biomedical Optics*. — 2004. — V.9, № 2. — P. 265–274.

131. Roggan A., Dorschel K., Minet O., Wolff D., Muller G. The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range // *Laser-Induced Interstitial Therapy*. — 1995. — P. 10–44.

132. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Review of Medical Devices*. — 2010. — V.7, № 6. — P. 825–842.

133. Larin K. V., Ghosn M. G., Bashkatov A. N., Genina E. A., Trunina N. A., Tuchin V. V. Optical clearing for OCT image enhancement and in-depth monitoring of molecular diffusion // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 2011. — V.18, № 3. — P. 1244–1259.

134. Hama H., Hioki H., Namiki K., Hoshida T., Kurokawa H., Ishidate F., Kaneko T., Akagi T., Saito T., Saido T. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging // *Nature Neuroscience*. — 2015. — V.18, № 10. — P. 1518–1529.

135. Hama H., Kurokawa H., Kawano H., Ando R., Shimogori T., Noda H., Fukami K., Sakaue-Sawano A., Miyawaki A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain // *Nature Neuroscience*. — 2011. — V.14, № 11. — P. 1481–1488.

136. Genin V. D., Tuchina D. K., Sadeq A. J., Genina E. A., Tuchin V. V., Bashkatov A. N.

Ex vivo investigation of glycerol diffusion in skin tissue // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2016. — V.2, № 1.

137. Tuchin V. V. A clear vision for laser diagnostics // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 2007. — V.13, № 6. — P. 1621–1628.

138. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V. V., Zhu D. In vivo skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism // *Journal of Biophotonics*. — 2010. — V.3, № 1-2. — P. 44–52.

139. Hirshburg J., Choi B., Nelson J. S., Yeh A. T. Collagen solubility correlates with skin optical clearing // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V.11, № 4. — P. 40501.

140. Hirshburg J., Choi B., Nelson J. S., Yeh A. T. Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2007. — V.39, № 2. — P. 140–144.

141. Hirshburg J. M., Ravikumar K. M., Hwang W., Yeh A. T. Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues // *Journal of Biomedical Optics*. — 2010. — V.15, № 5. — P. 55002.

142. Yeh A. T., Choi B., Nelson J. S., Tromberg B. J. Reversible dissociation of collagen in tissues // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2003. — V.121, № 6. — P. 1332–1335.

143. Berezin K. V., Dvoretzki K. N., Chernavina M. L., Likhter A. M., Smirnov V. V., Shagautdinova I. T., Antonova E. M., Stepanovich E. Y., Dzhalmuhambetova E. A., Tuchin V. V. Molecular modeling of immersion optical clearing of biological tissues // *Journal of Molecular Modeling*. — 2018. — V.24, № 2. — P. 45.

144. Аскаръян Г. А. Увеличение прохождения лазерного и другого излучения через мягкие мутные физические и биологические среды // *Квантовая Электроника*. — 1982. — V.9, № 7. — P. 1379–1383.

145. Chan E. K., Sorg B., Protsenko D., O'Neil M., Motamedi M., Welch A. J. Effects of

compression on soft tissue optical properties // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 1996. — V.2, № 4. — P. 943–950.

146. Hoyt L. F. New table of the refractive index of pure glycerol at 20 C // *Industrial & Engineering Chemistry*. — 1934. — V.26, № 3. — P. 329–332.

147. Genina E. A., Bashkatov A. N., Kochubey V. I., Tuchin V. V. Optical clearing of human dura mater // *Optics and Spectroscopy*. — 2005. — V.98, № 3. — P. 470–476.

148. Vargas G., Chan E. K., Barton J. K., Rylander III H. G., Welch A. J. Use of an agent to reduce scattering in skin // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 1999. — V.24, № 2. — P. 133–141.

149. Bashkatov A. N., Genina E. A., Sinichkin Y. P., Kochubey V. I., Lakodina N. A., Tuchin V. V. Glucose and mannitol diffusion in human dura mater // *Biophysical Journal*. — 2003. — V.85, № 5. — P. 3310–3318.

150. Vargas G., Barton J. K., Welch A. J. Use of hyperosmotic chemical agent to improve the laser treatment of cutaneous vascular lesions // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 2. — P. 21114.

151. Sun R. W., Tuchin V. V., Zharov V. P., Galanzha E. I., Richter G. T. Current status, pitfalls and future directions in the diagnosis and therapy of lymphatic malformation // *Journal of Biophotonics*. — 2018. — V.11, № 8. — P. e201700124.

152. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Оптическое просветление склеры глаза in vivo под действием глюкозы // *Квантовая Электроника*. — 2006. — V.36, № 12. — P. 1119–1124.

153. Bashkatov A. N., Korolevich A. N., Tuchin V. V., Sinichkin Y. P., Genina E. A., Stolnitz M. M., Dubina N. S., Vecherinski S. I., Belsley M. S. In vivo investigation of human skin optical clearing and blood microcirculation under the action of glucose solution // *Asian Journal of Physics*. — 2006. — V.15, № 1. — P. 1–14.

154. Galanzha E. I., Tuchin V. V, Solovieva A. V, Stepanova T. V, Luo Q., Cheng H. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2003. — V.36, № 14. — P. 1739.
155. Zhu D., Zhang J., Cui H., Mao Z., Li P., Luo Q. Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorioallantoic membrane // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 2. — P. 21106.
156. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Синичкин Ю. П., Тучин В. В. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования ex vivo и in vivo // *Оптика и Спектроскопия*. — 2010. — V.109, № 2. — P. 256–263.
157. Choi B., Tsu L., Chen E., Ishak T. S., Iskandar S. M., Chess S., Nelson J. S. Determination of chemical agent optical clearing potential using in vitro human skin // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2005. — V.36, № 2. — P. 72–75.
158. Khan M. H., Choi B., Chess S., Kelly K. M., McCullough J., Nelson J. S. Optical Clearing of in Vivo Human Skin: Implications for Light-Based Diagnostic Imaging and Therapeutics // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2004. — V.34, № 2. — P. 83–85.
159. Mao Z., Zhu D., Hu Y., Wen X., Han Z. Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 2. — P. 21104.
160. Proskurin S. G., Meglinski I. V. Optical coherence tomography imaging depth enhancement by superficial skin optical clearing // *Laser Physics Letters*. — 2007. — V.4, № 11. — P. 824.
161. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Optical Clearing of Cranial Bone. // *Advances in Optical Technologies*. — 2008.
162. Zhu Z., Wu G., Wei H., Yang H., He Y., Xie S., Zhao Q., Guo X. Investigation of the permeability and optical clearing ability of different analytes in human normal and

cancerous breast tissues by spectral domain OCT // *Journal of Biophotonics*. — 2012. — V.5, № 7. — P. 536–543.

163. Genina E. A., Bashkatov A. N., Korobko A. A., Zubkova E. A., Tuchin V. V., Yaroslavsky I. V., Altshuler G. B. Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 2. — P. 21102.

164. Ghosn M. G., Tuchin V. V., Larin K. V. Depth-resolved monitoring of glucose diffusion in tissues by using optical coherence tomography // *Optics Letters*. — 2006. — V.31, № 15. — P. 2314–2316.

165. Wang Y., Ji W., Yu Z., Li R., Wang X., Song W., Ruan W., Zhao B., Ozaki Y. Contribution of hydrogen bonding to charge-transfer induced surface-enhanced Raman scattering of an intermolecular system comprising p-aminothiophenol and benzoic acid // *Physical Chemistry Chemical Physics*. — 2014. — V.16, № 7. — P. 3153–3161.

166. Лакодина Н. А., Тучин В. В. Определение коэффициента диффузии глюкозы в склере глаза человека // *Биофизика*. — 2003. — V.48, № 2. — P. 309–313.

167. Jiang J., Wang R. K. Comparing the synergistic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue in vitro // *Physics in Medicine & Biology*. — 2004. — V.49, № 23. — P. 5283.

168. Zhong H., Guo Z., Wei H., Guo L., Wang C., He Y., Xiong H., Liu S. Synergistic effect of ultrasound and thiazone–PEG 400 on human skin optical clearing in vivo // *Photochemistry and Photobiology*. — 2010. — V.86, № 3. — P. 732–737.

169. Xu X., Wang R. K. Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy // *Physics in Medicine & Biology*. — 2004. — V.49, № 3. — P. 457.

170. Ding Y., Wang J., Fan Z., Wei D., Shi R., Luo Q., Zhu D., Wei X. Signal and depth

enhancement for in vivo flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents // *Biomedical Optics Express*. — 2013. — V.4, № 11. — P. 2518–2526.

171. Guo L., Shi R., Zhang C., Zhu D., Ding Z., Li P. Optical coherence tomography angiography offers comprehensive evaluation of skin optical clearing in vivo by quantifying optical properties and blood flow imaging simultaneously // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — V.21, № 8. — P. 81202.

172. Deng Z., Jing L., Wu N., Jiang X., Ren Q., Li C. Viscous optical clearing agent for in vivo optical imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.19, № 7. — P. 76019.

173. Jin X., Deng Z., Wang J., Ye Q., Mei J., Zhou W., Zhang C., Tian J. Study of the inhibition effect of thiazone on muscle optical clearing // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — V.21, № 10. — P. 105004.

174. Wang J., Shi R., Zhu D. Switchable skin window induced by optical clearing method for dermal blood flow imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.18, № 6. — P. 61209.

175. Shi R., Chen M., Tuchin V. V, Zhu D. Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing // *Biomedical Optics Express*. — 2015. — V.6, № 6. — P. 1977–1989.

176. Plotnikov S., Juneja V., Isaacson A. B., Mohler W. A., Campagnola P. J. Optical clearing for improved contrast in second harmonic generation imaging of skeletal muscle // *Biophysical Journal*. — 2006. — V.90, № 1. — P. 328–339.

177. Wen X., Jacques S. L., Tuchin V. V, Zhu D. Enhanced optical clearing of skin in vivo and optical coherence tomography in-depth imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.17, № 6. — P. 66022.

178. Vargas G., Readinger A., Dozier S. S., Welch A. J. Morphological Changes in Blood Vessels Produced by Hyperosmotic Agents and Measured by Optical Coherence

Tomography // *Photochemistry and Photobiology*. — 2003. — V.77, № 5. — P. 541–549.

179. Shi R., Guo L., Zhang C., Feng W., Li P., Ding Z., Zhu D. A useful way to develop effective in vivo skin optical clearing agents // *Journal of Biophotonics*. — 2017. — V.10, № 6–7. — P. 887–895.

180. Xu X., Zhu Q. Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer // *Optics Communications*. — 2007. — V.279, № 1. — P. 223–228.

181. Zhi Z., Han Z., Luo Q., Zhu D. Improve optical clearing of skin in vitro with propylene glycol as a penetration enhancer // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2009. — V.2, № 03. — P. 269–278.

182. Caspers P. J., Williams A. C., Carter E. A., Edwards H. G. M., Barry B. W., Bruining H. A., Puppels G. J. Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy // *Pharmaceutical Research*. — 2002. — V.19, № 10. — P. 1577–1580.

183. Notman R., Otter W. K. den, Noro M. G., Briels W. J., Anwar J. The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics // *Biophysical Journal*. — 2007. — V.93, № 6. — P. 2056–2068.

184. Vejnovic I., Simmler L., Betz G. Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate // *International Journal of Pharmaceutics*. — 2010. — V.386, № 1–2. — P. 185–194.

185. Kurihara-Bergstrom T., Knutson K., DeNoble L. J., Goates C. Y. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol–water systems in human skin // *Pharmaceutical Research*. — 1990. — V.7, № 7. — P. 762–766.

186. Timoshina P. A., Zinchenko E. M., Tuchina D. K., Sagatova M. M., Semyachkina-Glushkovskaya O. V., Tuchin V. V. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow

of newborn mice at optical clearing // *International Society for Optics and Photonics*. — 2017. — P. 1033610.

187. Liu P., Huang Y., Guo Z., Wang J., Zhuang Z., Liu S. Discrimination of dimethyl sulphoxide diffusion coefficient in the process of optical clearing by confocal micro-Raman spectroscopy // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — V.18, № 2. — P. 20507.

188. Samatham R., Phillips K. G., Jacques S. L. Assessment of optical clearing agents using reflectance-mode confocal scanning laser microscopy // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2010. — V.3, № 03. — P. 183–188.

189. Millon S. R., Roldan-Perez K. M., Riching K. M., Palmer G. M., Ramanujam N. Effect of optical clearing agents on the in vivo optical properties of squamous epithelial tissue // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2006. — V.38, № 10. — P. 920–927.

190. Vargas G., Chan K. F., Thomsen S. L., Welch A. J. Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue: effects on the detected fluorescence signal measured through skin // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2001. — V.29, № 3. — P. 213–220.

191. Weigmann H.-J., Lademann J., Schanzer S., Lindemann U., Pelchrzim R. Von, Schaefer H., Sterry W., Shah V. Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape-stripping to differences in bioavailability // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2001. — V.14, № Suppl. 1. — P. 98–102.

192. Stumpp O. F., Welch A. J., Milner T. E., Neev J. Enhancement of transepidermal skin clearing agent delivery using a 980 nm diode laser // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005. — V.37, № 4. — P. 278–285.

193. Liu C., Zhi Z., Tuchin V. V, Zhu D. Combined laser and glycerol enhancing skin optical clearing // *International Society for Optics and Photonics*. — 2009. — P. 71860D.

194. Stumpp O., Chen B., Welch A. J. Using sandpaper for noninvasive transepidermal

optical skin clearing agent delivery // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V.11, № 4. — P. 41118.

195. Lee W., Tsai R., Fang C., Liu C., Hu C., Fang J. Microdermabrasion as a novel tool to enhance drug delivery via the skin: an animal study // *Dermatologic Surgery*. — 2006. — V.32, № 8. — P. 1013–1022.

196. Tuchin V. V., Altshuler G. B., Gavrilova A. A., Pravdin A. B., Tabatadze D., Childs J., Yaroslavsky I. V. Optical clearing of skin using flashlamp-induced enhancement of epidermal permeability // *Lasers in Surgery and Medicine*. — 2006. — V.38, № 9. — P. 824–836.

197. Tezel A., Mitragotri S. Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis // *Biophysical Journal*. — 2003. — V.85, № 6. — P. 3502–3512.

198. Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen // *Annalen der Physik*. — 1931. — V.401, № 3. — P. 273–294.

199. Kaiser W., Garrett C. G. B. Two-photon excitation in Ca F<sub>2</sub>: Eu<sup>2+</sup> // *Physical Review Letters*. — 1961. — V.7, № 6. — P. 229.

200. Denk W., Piston D. W., Webb W. W. Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy. — Springer, 1995. — P. 445–458.

201. König K. Clinical multiphoton tomography // *Journal of Biophotonics*. — 2008. — V.1, № 1. — P. 13–23.

202. Tseng S., Lee Y.-H., Chen Z.-H., Lin H.-H., Lin C.-Y., Tang S.-C. Integration of optical clearing and optical sectioning microscopy for three-dimensional imaging of natural biomaterial scaffolds in thin sections // *Journal of Biomedical Optics*. — 2009. — V.14, № 4. — P. 44004.

203. Chiang A. S. Aqueous tissue clearing solution. — U.S. Patent No. 6472216.

Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office, 2002.

204. *Cicchi R., Sestini S., Giorgi V. De, Massi D., Lotti T., Pavone F. S.* Nonlinear laser imaging of skin lesions // *Journal of Biophotonics*. — 2008. — V.1, № 1. — P. 62–73.
205. *Hovhannisyanyan V. A., Hu P.-S., Chen S.-J., Kim C.-S., Dong C.-Y.* Elucidation of the mechanisms of optical clearing in collagen tissue with multiphoton imaging // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — V.18, № 4. — P. 46004.
206. *Migacheva E. V, Pravdin A. B., Tuchin V. V.* Alterations in autofluorescence signal from rat skin ex vivo under optical immersion clearing // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2010. V.3, № 03. — P. 147–152.
207. *Raman C. V.* A new radiation. // *Indian Journal of Physics*. — 1928. V.2, P. 387-398.
208. *Abramczyk H.* Introduction to laser spectroscopy. — Elsevier, 2005.
209. *Smith E., Dent G.* Modern Raman spectroscopy: a practical approach, 2005.
210. *Kong K., Kendall C., Stone N., Notingher I.* Raman spectroscopy for medical diagnostics—From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2015. — V.89,. — P. 121–134.
211. *Krafft C., Schmitt M., Schie I. W., Cialla-May D., Matthäus C., Bocklitz T., Popp J.* Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches // *Angewandte Chemie International Edition*. — 2017. — V.56, № 16. — P. 4392–4430.
212. *Jermyn M., Desroches J., Aubertin K., St-Arnaud K., Madore W.-J., Montigny E. De, Guiot M.-C., Trudel D., Wilson B. C., Petrecca K.* A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology // *Physics in Medicine & Biology*. — 2016. — V.61, № 23. — P. R370.
213. *Binder L., SheikhRezaei S., Baiertl A., Gruber L., Wolzt M., Valenta C.* Confocal

Raman spectroscopy: In vivo measurement of physiological skin parameters—A pilot study // *Journal of Dermatological Science*. — 2017. — V.88, № 3. — P. 280–288.

214. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darvin M. E. Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy // *Scientific Reports*. — 2017. — V.7, № 1. — P. 1–13.

215. Darvin M. E., Gersonde I., Ey S., Brandt N. N., Albrecht H., Gonchukov S. A., Sterry W., Lademann J. Noninvasive detection of beta-carotene and lycopene in human skin using Raman spectroscopy // *Laser Physics-Lawrence*. — 2004. — V.14, № 2. — P. 231–233.

216. Richters R. J. H., Falcone D., Uzunbajakava N. E., Varghese B., Caspers P. J., Puppels G. J., Erp P. E. J. van, Kerkhof P. C. M. van de Sensitive skin: assessment of the skin barrier using confocal Raman microspectroscopy // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2017. — V.30, № 1. — P. 1–12.

217. Choe C., Lademann J., Darvin M. E. Analysis of human and porcine skin in vivo/ex vivo for penetration of selected oils by confocal Raman microscopy // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2015. — V.28, № 6. — P. 318–330.

218. Binder L., Kulovits E. M., Petz R., Ruthofer J., Baurecht D., Klang V., Valenta C. Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy—A comparative study // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. — 2018. — V.130,. — P. 214–223.

219. McNichols R. J., Cote G. L. Optical glucose sensing in biological fluids: an overview // *Journal of Biomedical Optics*. — 2000. — V.5, № 1. — P. 5–17.

220. Quatela A., Miloudi L., Tfayli A., Baillet-Guffroy A. In vivo Raman microspectroscopy: intra-and intersubject variability of stratum corneum spectral markers // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2016. — V.29, № 2. — P. 102–109.

221. Zimmerley M., McClure R. A., Choi B., Potma E. O. Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy // *Applied Optics*. — 2009. — V.48, № 10. — P. D79–D87.
222. Huang D., Zhang W., Zhong H., Xiong H., Guo X., Guo Z. Optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Raman microspectroscopy // *Journal of Biomedical Optics*. — 2012. — V.17, № 1. — P. 15004.
223. Kim S., Byun K. M., Lee S. Y. Influence of water content on Raman spectroscopy characterization of skin sample // *Biomedical Optics Express*. — 2017. — V.8, № 2. — P. 1130–1138.
224. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darvin M. E. Human skin in vivo has a higher skin barrier function than porcine skin ex vivo—comprehensive Raman microscopic study of the stratum corneum // *Journal of Biophotonics*. — 2018. — V.11, № 6. — P. e201700355.
225. Hokr B. H., Yakovlev V. V. Raman signal enhancement via elastic light scattering // *Optics Express*. — 2013. — V.21, № 10. — P. 11757–11762.
226. Matousek P. Raman signal enhancement in deep spectroscopy of turbid media // *Applied Spectroscopy*. — 2007. — V.61, № 8. — P. 845–854.
227. Oelkrug D., Boldrini B., Rebner K. Comparative Raman study of transparent and turbid materials: models and experiments in the remote sensing mode // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2017. — V.409, № 3. — P. 673–681.
228. Darvin M. E., Schleusener J., Parenz F., Seidel O., Krafft C., Popp J., Lademann J. Confocal Raman microscopy combined with optical clearing for identification of inks in multicolored tattooed skin in vivo // *Analyst*. — 2018. — V.143, № 20. — P. 4990–4999.
229. Zhu Y., Choe C.-S., Ahlberg S., Meinke M. C., Ulrike A., Lademann J. M., Darvin M. E. Penetration of silver nanoparticles into porcine skin ex vivo using fluorescence lifetime

imaging microscopy, Raman microscopy, and surface-enhanced Raman scattering microscopy // *Journal of Biomedical Optics*. — 2014. — V.20, № 5. — P. 51006.

230. Yamamoto Y. S., Ishikawa M., Ozaki Y., Itoh T. Fundamental studies on enhancement and blinking mechanism of surface-enhanced Raman scattering (SERS) and basic applications of SERS biological sensing // *Frontiers of Physics*. — 2014. — V.9, № 1. — P. 31–46.

231. Zhang Y., Li D., Zhou X., Gao X., Zhao S., Li C. Enhancing sensitivity of SERRS nanoprobes by modifying heptamethine cyanine-based reporter molecules // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. — 2016. — V.9, № 04. — P. 1642005.

232. Ozaki Y., Kneipp K., Aroca R. *Frontiers of surface-enhanced Raman scattering: single nanoparticles and single cells*. — John Wiley & Sons, 2014.

233. Zhang Y., Liu H., Tang J., Li Z., Zhou X., Zhang R., Chen L., Mao Y., Li C. Noninvasively imaging subcutaneous tumor xenograft by a handheld Raman detector, with the assistance of an optical clearing agent // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2017. — V.9, № 21. — P. 17769–17776.

234. Sullivan T. P., Eaglstein W. H., Davis S. C., Mertz P. The pig as a model for human wound healing // *Wound Repair and Regeneration*. — 2001. — V.9, № 2. — P. 66–76.

235. Darvin M. E., Richter H., Zhu Y. J., Meinke M. C., Knorr F., Gonchukov S. A., Koenig K., Lademann J. Comparison of in vivo and ex vivo laser scanning microscopy and multiphoton tomography application for human and porcine skin imaging // *Quantum Electronics*. — 2014. — V.44, № 7. — P. 646.

236. Mangelsdorf S., Vergou T., Sterry W., Lademann J., Patzelt A. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans // *Skin Research and Technology*. — 2014. — V.20, № 2. — P. 147–154.

237. OMNIPAQUE™ (iohexol) Injection, [Электронный ресурс]. Режим

доступа:[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/018956s099lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/018956s099lbl.pdf)

238. *Tatham A. J., Prydal J.* Do non-ionic contrast media temporarily improve corneal transparency? // *Journal of Ophthalmic & Vision Research.* — 2013. — V.8, № 4. — P. 400.

239. *Darvin M. E., Richter H., Ahlberg S., Haag S. F., Meinke M. C., Quintrec D. Le, Doucet O., Lademann J.* Influence of sun exposure on the cutaneous collagen/elastin fibers and carotenoids: negative effects can be reduced by application of sunscreen // *Journal of Biophotonics.* — 2014. — V.7, № 9. — P. 735–743.

240. *DermaInspect*, [Электронный ресурс]. Режим доступа:<https://mpt-tomography.de/dermainspect/>

241. *Schleusener J., Lademann J., Darvin M. E.* Depth-dependent autofluorescence photobleaching using 325, 473, 633, and 785 nm of porcine ear skin ex vivo // *Journal of Biomedical Optics.* — 2017. — V.22, № 9. — P. 91503.

242. *Yu T., Wen X., Luo Q., Zhu D., Tuchin V. V.* Quantitative analysis of dehydration in porcine skin for assessing mechanism of optical clearing // *Journal of Biomedical Optics.* — 2011. — V.16, № 9. — P. 95002.

243. *Association G. P.* Physical properties of glycerine and its solutions Glycerine. — Producers' Association, 1963.

244. *Cheng N.-S.* Formula for the viscosity of a glycerol– water mixture // *Industrial & Engineering Chemistry Research.* — 2008. — V.47, № 9. — P. 3285–3288.

245. *Fluhr J. W., Darlenski R., Surber C.* Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions // *British Journal of Dermatology.* — 2008. — V.159, № 1. — P. 23–34.

246. *Son T., Jung B.* Cross-evaluation of optimal glycerol concentration to enhance optical tissue clearing efficacy // *Skin Research and Technology.* — 2015. — V.21, № 3. — P.

327–332.

247. *LaComb R., Nadiarnykh O., Carey S., Campagnola P. J.* Quantitative second harmonic generation imaging and modeling of the optical clearing mechanism in striated muscle and tendon // *Journal of Biomedical Optics*. — 2008. — V.13, № 2. — P. 21109.
248. *Rommel C. E., Dierker C., Schmidt L., Przibilla S., Bally G. von, Kemper B., Schnekenburger J.* Contrast-enhanced digital holographic imaging of cellular structures by manipulating the intracellular refractive index // *Journal of Biomedical Optics*. — 2010. — V.15, № 4. — P. 41509.
249. *Farage M. A., Miller K. W., Maibach H. I.* Textbook of aging skin. — Springer Science & Business Media, 2009.
250. *Samatham R., Wang N. K., Jacques S. L.* Investigation of the effect of hydration on dermal collagen in ex vivo human skin tissue using second harmonic generation microscopy // *International Society for Optics and Photonics*. — 2016. — P. 96890W.
251. *Tuchin V. V.* Optical clearing of tissues and blood using the immersion method // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2005. — V.38, № 15. — P. 2497.
252. *Wang R. K., Xu X., Tuchin V. V., Elder J. B.* Concurrent enhancement of imaging depth and contrast for optical coherence tomography by hyperosmotic agents // *Journal of the Optical Society of America B*. — 2001. — V.18, № 7. — P. 948–953.
253. *Weinigel M., Breunig H. G., Darvin M. E., Klemp M., Rówert-Huber J., Lademann J., König K.* Impact of refractive index mismatches on coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton autofluorescence tomography of human skin in vivo // *Physics in Medicine & Biology*. — 2015. — V.60, № 17. — P. 6881.
254. *Kallaway C., Almond L. M., Barr H., Wood J., Hutchings J., Kendall C., Stone N.* Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. — 2013. — V.10, № 3. — P. 207–219.

255. Darvin M. E., Thiede G., Ascencio S. M., Schanzer S., Richter H., Vinzón S. E., Hasche D., Rösl F., May R., Hazot Y. In vivo/ex vivo targeting of Langerhans cells after topical application of the immune response modifier TMX-202: confocal Raman microscopy and histology analysis // *Journal of Biomedical Optics*. — 2016. — V.21, № 5. — P. 55004.
256. Lui H., Zhao J., McLean D., Zeng H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis // *Cancer Research*. — 2012. — V.72, № 10. — P. 2491–2500.
257. Darvin M. E., Meinke M. C., Sterry W., Lademann J. M. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin // *Journal of Biomedical Optics*. — 2013. — V.18, № 6. — P. 61230.
258. Caspers P. J., Bruining H. A., Puppels G. J., Lucassen G. W., Carter E. A. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2001. — V.116, № 3. — P. 434–442.
259. Janssens M., Smeden J. van, Puppels G. J., Lavrijsen A. P. M., Caspers P. J., Bouwstra J. A. Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with atopic eczema // *British Journal of Dermatology*. — 2014. — V.170, № 6. — P. 1248–1255.
260. Cals F. L. J., Koljenović S., Hardillo J. A., Jong R. J. B. de, Schut T. C. B., Puppels G. J. Development and validation of Raman spectroscopic classification models to discriminate tongue squamous cell carcinoma from non-tumorous tissue // *Oral Oncology*. — 2016. — V.60,. — P. 41–47.
261. Choo-Smith L., Edwards H. G. M., Endtz H. P., Kros J. M., Heule F., Barr H., Robinson Jr J. S., Bruining H. A., Puppels G. J. Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. — 2002. — V.67, № 1. — P. 1–9.

262. Akhalaya M. Y., Maksimov G. V, Rubin A. B., Lademann J., Darvin M. E. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin // *Ageing Research Reviews*. — 2014. — V.16,. — P. 1–11.
263. gen2-SCA, [Электронный ресурс]. Режим доступа:<https://www.integralcorp.jp/product/product.php?id=37>.
264. Bykov A., Hautala T., Kinnunen M., Popov A., Karhula S., Saarakkala S., Nieminen M. T., Tuchin V. Optical clearing of articular cartilage: a comparison of clearing agents // *Optical Society of America*. — 2015. — P. 95400A.
265. Votteler M., Carvajal Berrio D. A., Pudlas M., Walles H., Stock U. A., Schenke-Layland K. Raman spectroscopy for the non-contact and non-destructive monitoring of collagen damage within tissues // *Journal of Biophotonics*. — 2012. — V.5, № 1. — P. 47–56.
266. Nguyen T. T., Happillon T., Feru J., Brassart-Passco S., Angiboust J., Manfait M., Piot O. Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration // *Journal of Raman Spectroscopy*. — 2013. — V.44, № 9. — P. 1230–1237.
267. Zhang Q., Andrew Chan K. L., Zhang G., Gillece T., Senak L., Moore D. J., Mendelsohn R., Flach C. R. Raman microspectroscopic and dynamic vapor sorption characterization of hydration in collagen and dermal tissue // *Biopolymers*. — 2011. — V.95, № 9. — P. 607–615.
268. Schut T. C. B., Caspers P. J., Puppels G. J., Nijssen A., Heule F., Neumann M. H. A., Hayes D. P. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2002. — V.119, № 1. — P. 64–69.
269. Gniadecka M., Wulf H. C., Nielsen O. F., Christensen D. H., Hercogova J.

Distinctive molecular abnormalities in benign and malignant skin lesions: studies by Raman spectroscopy // *Photochemistry and Photobiology*. — 1997. — V.66, № 4. — P. 418–423.

270. Drug Approval Package, [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/pre96/018956-s28\\_omnipaque\\_toc.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/pre96/018956-s28_omnipaque_toc.cfm).

271. Jiang J., Wang R. K. How different molarities of oleic acid as enhancer exert its effect on optical clearing of skin tissue in vitro // *Journal of X-Ray Science and Technology*. — 2005. — V.13, № 3. — P. 149–159.

272. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darvin M. E. Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo // *Mechanisms of Ageing and Development*. — 2018. — V.172,. — P. 6–12.

273. Miloudi L., Bonnier F., Tfayli A., Yvergnaux F., Byrne H. J., Chourpa I., Munnier E. Confocal Raman spectroscopic imaging for in vitro monitoring of active ingredient penetration and distribution in reconstructed human epidermis model // *Journal of Biophotonics*. — 2018. — V.11, № 4. — P. e201700221.

274. Souza C., Campos P. M., Schanzer S., Albrecht S., Lohan S. B., Lademann J., Darvin M. E., Meinke M. C. Radical-scavenging activity of a sunscreen enriched by antioxidants providing protection in the whole solar spectral range // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2017. — V.30, № 2. — P. 81–89.

275. Caspers P. J., Lucassen G. W., Bruining H. A., Puppels G. J. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin // *Journal of Raman Spectroscopy*. — 2000. — V.31, № 8-9. — P. 813–818.

276. Nakagawa N., Matsumoto M., Sakai S. In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy // *Skin Research and Technology*. — 2010. — V.16, № 2. — P. 137–141.
277. Choe C., Lademann J., Darvin M. E. Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo // *Analyst*. — 2016. — V.141, № 22. — P. 6329–6337.
278. Robert C., Bonnet M., Marques S., Numa M., Doucet O. Low to moderate doses of infrared A irradiation impair extracellular matrix homeostasis of the skin and contribute to skin photodamage // *Skin Pharmacology and Physiology*. — 2015. — V.28, № 4. — P. 196–204.
279. Darvin M. E., Gersonde I., Albrecht H., Zastrow L., Sterry W., Lademann J. In vivo Raman spectroscopic analysis of the influence of IR radiation on the carotenoid antioxidant substances beta-carotene and lycopene in the human skin. Formation of free radicals // *Laser Physics Letters*. — 2007. — V.4, № 4. — P. 318.
280. Cleveland W. S., Devlin S. J. Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting // *Journal of the American Statistical Association*. — 1988. — V.83, № 403. — P. 596–610.
281. Percot A., Lafleur M. Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman microspectroscopy // *Biophysical Journal*. — 2001. — V.81, № 4. — P. 2144–2153.
282. Leikin S., Parsegian V. A., Yang W.-H., Walrafen G. E. Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1997. — V.94, № 21. — P. 11312–11317.
283. Choe C.-S., Lademann J., Darvin M. E. Gaussian-function-based deconvolution method to determine the penetration ability of petrolatum oil into in vivo human skin using

confocal Raman microscopy // *Laser Physics*. — 2014. — V.24, № 10. — P. 105601.

284. Maeda Y., Kitano H. The structure of water in polymer systems as revealed by Raman spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. — 1995. — V.51, № 14. — P. 2433–2446.

285. Rylander M. N., Feng Y., Zhang Y., Bass J., Stafford R. J., Volgin A., Hazle J. D., Diller K. R. Optimizing heat shock protein expression induced by prostate cancer laser therapy through predictive computational models // *Journal of Biomedical Optics*. — 2006. — V.11, № 4. — P. 41113.

286. Carvalho S., Gueiral N., Nogueira E., Henrique R., Oliveira L., Tuchin V. V. Glucose diffusion in colorectal mucosa—a comparative study between normal and cancer tissues // *Journal of Biomedical Optics*. — 2017. — V.22, № 9. — P. 91506.

287. Schulz B., Chan D., Bäckström J., Rübhausen M. Spectroscopic ellipsometry on biological materials—investigation of hydration dynamics and structural properties // *Thin Solid Films*. — 2004. — V.455,. — P. 731–734.

288. Gurjarpadhye A. A., Vogt W. C., Liu Y., Rylander C. G. Effect of localized mechanical indentation on skin water content evaluated using OCT // *International Journal of Biomedical Imaging*. — 2011. — V.2011.

289. Ventura S. A., Kasting G. B. Dynamics of glycerine and water transport across human skin from binary mixtures // *International Journal of Cosmetic Science*. — 2017. — V.39, № 2. — P. 165–178.

290. Carneiro I., Carvalho S., Henrique R., Oliveira L., Tuchin V. V. Simple multimodal optical technique for evaluation of free/bound water and dispersion of human liver tissue // *Journal of Biomedical Optics*. — 2017. — V.22, № 12. — P. 125002.

291. Oliveira L. M., Carvalho M. I., Nogueira E. M., Tuchin V. V. Skeletal muscle dispersion (400-1000 nm) and kinetics at optical clearing // *Journal of Biophotonics*. —

2018. — V.11, № 1. — P. e201700094.

292. *Utz S. R., Tuchin V. V., Galkina E. M.* The dynamics of some human skin biophysical parameters in the process of optical clearing after hyperosmotic solutions topical application // *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. — 2015. — V.91, № 4. — P. 60–68.

293. *Kolesnikov A. S., Kolesnikova E. A., Kolesnikova K. N., Tuchina D. K., Popov A. P., Skaptsov A. A., Nazarov M. M., Shkurinov A. P., Terentyuk A. G., Tuchin V. V.* THz monitoring of the dehydration of biological tissues affected by hyperosmotic agents // *Physics of Wave Phenomena*. — 2014. — V.22, № 3. — P. 169–176.

294. *Wilhelm K.-P., Elsner P., Berardesca E., Maibach H. I.* Bioengineering of the skin: skin imaging & analysis. — CRC press, 2006.

295. *Wiechers J. W., Dederen J. C., Rawlings A. V.* Moisturization mechanisms: internal occlusion by orthorhombic lipid phase stabilizers—a novel mechanism of action of skin moisturization. — CRC Press, 2016. — P. 331–344.