

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи



Зайцев Сергей Михайлович

**Разработка мультимодальных подходов к исследованию кожи для целей  
оптической диагностики патологических образований**

Специальность 1.5.2. - Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
д.ф.-м.н., профессор Э.А. Генина

Саратов  
2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>ГЛАВА 1. Обзор литературы</b>	14
1.1. <b>Строение и оптические свойства кожи</b>	14
1.1.1. Эпидермис	15
1.1.2. Дерма	17
1.1.3. Гиподерма	19
1.1.4. Ограничения применения оптических методов	21
1.2. <b>Оптические методы диагностики кожи</b>	22
1.2.1. Спектральные методы	22
1.2.2. Методы визуализации	31
1.2.3. Комбинированные методы	32
1.3. <b>Оптическое просветление кожи</b>	34
1.3.1. Принцип действия	35
1.3.2. Оптические просветляющие агенты (ОПА)	37
1.3.3. Усилители проницаемости	40
1.3.4. Применение оптического просветления в оптических методах диагностики кожи	43
<b>Выводы</b>	45
<b>ГЛАВА 2. Экспериментальное исследование эффекта оптического просветления в сочетании с бимодальным методом оптической диагностики</b>	46
2.1. <b>Введение</b>	46
2.2. <b>Методы и материалы</b>	46
2.3. <b>Результаты и обсуждение</b>	56
2.4. <b>Выводы</b>	77
<b>ГЛАВА 3. Экспериментальное исследование эффекта биосовместимого усиленного оптического просветления кожи человека <i>in vivo</i> методом конфокальной оптической когерентной томографии с линейным полем</b>	79

3.1. Введение	79
3.2. Методы и материалы	80
3.3. Результаты и обсуждение	89
3.4. Выводы	96
<b>ГЛАВА 4. Экспериментальное исследование эффекта биосовместимого усиленного оптического просветления меланомы мыши <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> методом спектроскопии диффузного отражения</b>	97
4.1. Введение	97
4.2. Методы и материалы	97
4.3. Результаты и обсуждение	102
4.4. Выводы	109
<b>ГЛАВА 5. Экспериментальное исследование увеличения глубины детектирования нано- и субмикронных частиц в коже при ОКТ-визуализации с помощью оптического просветления</b>	111
5.1. Введение	111
5.2. Методы и материалы	111
5.3. Результаты и обсуждение	120
5.4. Выводы	131
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	133
<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>	136
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	137

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

<b>АФ</b>	Автофлуоресценция
<b>AUC</b>	Область под кривой (Area Under the Curve)
<b>БКК</b>	Базальноклеточная карцинома
<b>Сe6</b>	Хлорин e6 (Chlorin e6)
<b>DFS</b>	Drug-induced Fluorescence Spectroscopy
<b>ДМСО</b>	Диметилсульфоксид
<b>ДО</b>	Диффузное отражение
<b>ГК</b>	Гиалуроновая кислота
<b>LC-ОСТ</b>	Конфокальная ОКТ с линейным полем (Line-field Confocal Optical Coherence Tomography)
<b>NA</b>	Числовая апертура (Numerical Aperture)
<b>NIR</b>	Ближний инфракрасный (Near Infrared)
<b>ОГД</b>	Оптическая глубина детектирования
<b>ОГЗ</b>	Оптическая глубина зондирования
<b>ОП</b>	Оптическое просветление
<b>ОПА</b>	Оптический просветляющий агент
<b>ОКТ</b>	Оптическая Когерентная Томография
<b>ПЭГ</b>	Полиэтиленгликоль
<b>ПГ</b>	Пропиленгликоль
<b>ПП</b>	Показатель преломления
<b>РС</b>	Роговой слой
<b>SDS</b>	Расстояние источник-приёмник (Source-Detector Separation)

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень её разработанности

Одной из основных задач в современной медицине является диагностика и терапия патологических образований. Среди них особое внимание уделяется патологическим образованиям кожи человека, так как кожа образует наружный покров тела, выполняет множество жизненно важных функций (иммунную, терморегулирующую, секреторную, и др.) и является главным барьером между организмом и окружающей средой. Рак кожи в настоящее время является одним из самых часто встречающихся типов рака у людей. Базальноклеточная карцинома (БКК) – наиболее распространённый тип рака кожи, диагностируемый в 8 случаях из 10 [1]. Типичными местами появления этого вида рака являются участки тела, наиболее активно подвергающиеся воздействию солнечного излучения (например, область головы и шеи). Специфика локализации БКК приводит к необходимости чрезвычайно точного метода определения границ зоны поражения, так как при сохранении живых раковых клеток на периферии области воздействия существует риск рецидива, а чрезмерное иссечение здоровых участков кожи (при хирургических процедурах) чревато эстетическими проблемами (если не применяется методика фотодинамической терапии - ФДТ). Традиционным методом диагностики рака кожи является гистопатологическое исследование, которое включает взятие образца ткани из подозрительного участка кожи для последующего лабораторного исследования. Среди очевидных недостатков данного метода можно выделить его низкую точность определения геометрии поражения, инвазивность и большое время анализа полученных образцов. За последние 50 лет методы оптической визуализации и спектроскопии [2]–[7], основанные на взаимодействии света с биологическими тканями, широко использовались для анализа эпителиальных тканей в целом и тканей кожи в частности [8]–[13]. Их ключевыми особенностями является неинвазивность, атравматичность, высокая чувствительность, сравнительно низкая стоимость и большой потенциал применения в клинических условиях, что делает их важным дополнением в качестве диагностических инструментов *in vivo* к уже используемому золотому стандарту, такому как гистопатология. Методы *in vivo* спектроскопии диффузного отражения (ДО) кожи [14]–[16] и спектроскопии автофлуоресценции (АФ) [8], [9], [17]–[19], или же комбинация этих двух методов [7], [20], [21], а также использование нескольких длин волн возбуждения для повышения диагностической точности [22] этих методов, были исследованы на предмет их применимости для получения взаимодополняющей информации о структурных и биохимических изменениях, сопровождающих развитие патологий в коже. Например, бимодальный анализ спектров ДО и АФ, возбуждённых на множестве длин волн [21]–[23] показал повышенную диагностическую

точность при различении трёх типов гиперплазии кожи мышей или при различении между нормальным столбчатым эпителием и предраковыми состояниями шейки матки, по сравнению с возбуждением АФ только одной длиной волны [24].

Стоит учесть также, что кожа представляет собой оптически гетерогенный многослойный орган, каждый из слоёв которого отличается по толщине и морфологии. Разные слои кожи и их компоненты могут быть подвержены изменениям в зависимости от типа и стадии патологического процесса. Таким образом, чтобы служить эффективным и точным дополнительным диагностическим инструментом, методы оптической спектроскопии должны обеспечивать пространственную дискриминацию (разрешение по глубине) между исследуемыми слоями [25]–[29].

Однако, из-за разницы в показателях преломления между различными компонентами слоёв кожи и межтканевой жидкости [30], а также из-за неоднородности своей многослойной структуры, кожа обладает сильными рассеивающими и поглощающими свойствами. Это ограничивает глубину проникновения света в кожу и, следовательно, разрешающую способность оптических методов [31]. Одним из способов повышения глубины зондирования, разрешения и контраста изображения оптических методов диагностики кожи является оптическое просветление (ОП) биотканей [32]–[35]. Принцип этой методики основан на использовании химических агентов, обладающих показателем преломления близким к основным рассеивающим компонентам кожи (волокон коллагена), что в итоге приводит к снижению оптической неоднородности кожи. В результате повышаются глубина зондирования и контраст визуализации с помощью оптических методов *in vivo*, так как повышается глубина проникновения фотонов в кожу.

Однако, во внимание должна быть также принята барьерная функция рогового слоя (РС) эпидермиса, которая ограничивает применения большинства из известных оптических просветляющих агентов (ОПА). В множестве исследований была продемонстрирована эффективность химических агентов, которые могут обратимо нарушать естественную структуру тканей рогового слоя, состоящих из кератинов и липидов, тем самым создавая пути проникновения ОПА через этот барьер. Такие вещества, называемые химическими усилителями проницаемости, представлены несколькими группами веществ, среди которых в научной литературе можно выделить несколько основных: спирты (этанол, пропиленгликоль) [36], сульфоксиды (диметилсульфоксид) [37], [38], жирные кислоты (олеиновая и линолевая кислоты) [37], [39], а также азон (и тиазон) [37], [40]. Использование ОПА в комбинации с усилителями проницаемости может значительно усилить эффект оптического просветления.

Учитывая вышесказанное, стоит полагать, что для повышения диагностической точности при клиническом анализе патологических образований кожи необходим мультимодальный

подход, предполагающий *in vivo* использование методов оптической спектроскопии и визуализации (или их комбинированное использование) с пространственным разрешением, методики оптического просветления кожи и методов усиления проницаемости кожи. Такой подход позволит объединить взаимодополняющие преимущества различных оптических методов диагностики кожи, пространственное разрешение позволит осуществлять диагностику кожи по глубине с отдельным анализом каждого из слоёв кожи, а технология оптического просветления в сочетании с методами усиления проницаемости поможет улучшить разрешение по глубине и контраст изображения оптических методов.

Принимая во внимание указанные выше проблемы, **целью исследования** является разработка комплексных подходов, включающих мультимодальную оптическую диагностику патологических образований кожи в сочетании с биосовместимыми методами оптического просветления и усиления проницаемости кожи.

Достижение указанной цели осуществлялось путём решения следующих **задач**:

1. Разработка биосовместимых сочетаний оптических просветляющих агентов и усилителей проницаемости, которые могут быть безопасно использованы *in vivo* в клинических условиях на поражённых участках кожи человека;
2. Экспериментальное исследование влияния оптического просветления кожи *ex vivo* с помощью различных оптических просветляющих агентов, включающих химические усилители проницаемости, на регистрируемые спектры автофлуоресценции и диффузного отражения;
3. Количественная оценка влияния дегидратации образца кожи на регистрируемые спектры коллимированного пропускания кожи *ex vivo*;
4. Исследование с помощью конфокальной оптической когерентной томографии с линейным полем (LC-OCT) особенностей оптического просветления кожи человека *in vivo* биосовместимыми оптическими просветляющими агентами в сочетании с химическими и физическими усилителями проницаемости;
5. Экспериментальная оценка с помощью спектроскопии диффузного отражения эффективности оптического просветления меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo* биосовместимыми оптическими просветляющими агентами в сочетании с химическими и физическими усилителями проницаемости;
6. Исследование с помощью оптической когерентной томографии влияния состава оптических просветляющих агентов на увеличение оптической глубины детектирования наночастиц в волосяном фолликуле при оптическом просветлении кожи.

## Научная новизна

В работе впервые, методом бимодальной (АФ и ДО) спектроскопии с пространственным разрешением, выполнено комплексное одновременное исследование влияния оптического просветления кожи при воздействии оптических просветляющих агентов в сочетании с химическими усилителями проницаемости, дегидратации, а также давления спектрального зонда, оказываемого на кожу, на результаты измерений. Впервые исследована кинетика изменения коэффициента полного ослабления света в коже *ex vivo* под влиянием дегидратации. Впервые разработаны и протестированы биосовместимые комбинации оптических просветляющих агентов и химических усилителей проницаемости, чьи концентрации удовлетворяют требованиям FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration)) по пороговой концентрации для клинического применения методики оптического просветления на пациентах. Разработан подход, включающий использование биосовместимых комбинаций оптических просветляющих агентов, химических и физических усилителей проницаемости, к улучшению оптической диагностики кожи человека *in vivo* и кожи мышей с меланомой *in vivo* и *ex vivo*.

## Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов для уточнения существующих и развития новых методик оптического просветления при оптической диагностике патологических образований кожи и смещением фокуса исследований с теоретических и лабораторных исследований на потенциальную практическую имплементацию оптического просветления в медицинскую диагностическую практику. Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку способствуют повышению эффективности и безопасности клинической диагностики и терапии патологических изменений кожи.

## Положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Особенность кинетики коэффициента коллимированного пропускания кожи *ex vivo* в процессе дегидратации на воздухе определяется двумя последовательными процессами, первый из которых связан с испарением свободной и слабосвязанной внутритканевой воды, а второй – с переходом сильносвязанной воды, содержащейся в коллагеновых волокнах дермы, во внутритканевое пространство.
2. При поверхностном просветлении кожи человека *ex vivo* динамика изменения регистрируемой флуоресценции зависит от расстояния источник-приёмник.

3. Применение дермабразии (не более 1 мин), сонофореза (не более 10 мин) и оптических просветляющих агентов, содержащих олеиновую кислоту, в разрешённой концентрации для клинического применения на коже *in vivo*, позволяет не только повысить эффективность оптического просветления, но и значительно ускорить его, в частности, при сонофорезе, достигнуть максимальной степени регистрируемого оптического просветления кожи.
4. Использование олеиновой кислоты в составе гиперосмотических просветляющих агентов для целевой доставки лекарственных препаратов в волосяные фолликулы предотвращает дегидратацию кожи, что позволяет увеличить контраст визуализации и до 7 раз увеличить регистрируемую оптическую глубину детектирования частиц в фолликулах с помощью ОКТ.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность описанных в диссертационном исследовании результатов, сделанных выводов, обсуждений и заключения подтверждается:

1. Использованием современного научно-исследовательского оборудования и программного обеспечения и применением апробированных методик расчёта.
2. Объёмом использованного в работе материала: 39 белых лабораторных крыс, 9 мышей, 1 штамм меланомы В16 для индуцирования модельной подкожной опухоли в экспериментах с мышами *in vivo* и *ex vivo*, 13 образцов кожи человека *ex vivo*, кожа *in vivo* трёх добровольцев; и применением традиционных статистических методов обработки результатов.
3. Воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их соответствием результатам, полученным другими авторами.
4. Опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных журналах.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствии с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами: РФФИ № 20–32–90043 Аспиранты и № 20–52–56005 Иран\_т, РФФИ № 17-73-20172, Минобрнауки России в рамках выполнения государственного задания (проект № FSRR-2023-0007), гранта Посольства Франции России в рамках стипендиальной программы франко-российской аспирантуры «Вернадский».

Основные результаты и положения диссертации были представлены, доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях:

1. Saratov Fall Meeting, SFM'18 - 6<sup>th</sup> International Symposium “Optics and Biophotonics” – 22<sup>nd</sup> International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2018, Saratov, Russia

2. 12<sup>th</sup> International Photonics and Optoelectronics Meetings, POEM 2019 – 7<sup>th</sup> Sino-French Optoelectronics Forum, Nov 2019, Wuhan, China
3. Saratov Fall Meeting, SFM'19 - 7<sup>th</sup> International Symposium “Optics and Biophotonics” - 23<sup>rd</sup> International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2019, Saratov, Russia
4. SPIE/COS Photonics Asia (Digital Forum), Oct 2020, Beijing, China
5. Saratov Fall Meeting, SFM'20 - 8<sup>th</sup> International Symposium “Optics and Biophotonics” – 24<sup>th</sup> International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2020, Saratov, Russia
6. 19<sup>th</sup> International Conference on Laser Optics, ICLO 2020 (6<sup>th</sup> International Symposium on Lasers in Medicine and Biophotonics), Nov 2020, St Petersburg, Russia
7. SPIE Photonics Europe 2020 (presentation at online forum), 06-10 april 2020
8. Saratov Fall Meeting, SFM'22 - 10<sup>th</sup> International Symposium “Optics and Biophotonics” – 26<sup>th</sup> International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, Sep 2022, Saratov, Russia
9. SPIE Photonics West 2023, 28 January -2 February 2023, San Francisco, United States
10. 16<sup>th</sup> International conference on Laser Applications in Life Science, LALS 2022, Apr 2022, Nancy, France

### **Личный вклад автора**

В рамках выполнения диссертационного исследования автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведенных исследований: от принятия участия в постановке задач и реализации поставленных научным руководителем задач до обсуждения результатов и написания статей.

Автор лично принимал участие в проведении всех экспериментов по оптическому просветлению *ex vivo* и *in vivo* кожи человека, мышей и крыс; разработке биосовместимых смесей ОПА; производстве флуоресцентного агарозного геля для гибридной модели кожа/гель; измерении оптических, геометрических и весовых параметров образцов; аналитической и статистической обработке полученных результатов; интерпретации результатов исследования; изложении полученных фактических данных в материалах диссертационной работы, статьях и главе монографии; подготовке докладов на научно-практических конференциях.

### **Публикация результатов исследований**

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ в том числе 8 работ в изданиях, рекомендованных ВАК, и зарубежных изданиях, индексируемых *Scopus* и *Web of Science*.

Опубликована глава в зарубежной монографии издательства *CRC Press*. Зарегистрирован 1 патент.

### Список публикаций по теме диссертации:

#### Статьи в журналах и сборниках трудов ВАК, *Scopus* и *Web of Science*:

1. **Sergey M. Zaytsev**, Marine Amouroux, Grégoire Khairallah, Alexey N. Bashkatov, Valery V. Tuchin, Walter Blondel, Elina A. Genina, (2022) Impact of optical clearing on ex vivo human skin optical properties characterized by spatially resolved multimodal spectroscopy, *Journal of Biophotonics*, 2022, 15 (1), e202100202. <https://doi.org/10.1002/jbio.202100202> (Scopus, WoS)
2. **Sergey M. Zaytsev**, Yulia I. Svenskaya, Ekaterina V. Lengert, Georgy S. Terentyuk, Alexey N. Bashkatov, Valery V. Tuchin, Elina A. Genina, (2020) Optimized skin optical clearing for optical coherence tomography monitoring of encapsulated drug delivery through the hair follicles, *Journal of Biophotonics*, 2020, 13 (4), e201960020. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960020> (Scopus, WoS)
3. Prisca Rakotomanga, Charles Soussen, Grégoire Khairallah, Marine Amouroux, **Sergey Zaytsev**, Elina Genina, Hang Chen, Alain Delconte, Christian Daul, Valery Tuchin, Walter Blondel, (2019) Source separation approach for the analysis of spatially resolved multiply excited autofluorescence spectra during optical clearing of ex vivo skin, *Biomedical optics express*, 2019, 10 (7), pp.3410-3424. DOI: 10.1364/BOE.10.003410 (Scopus, WoS)
4. W. Blondel, **S. Zaytsev**, V. Colas, G. Khairallah, P. Rakotomanga, C. Soussen, C. Daul, M. Amouroux, E. Genina, V. Tuchin, (2020) Study of the impact of optical clearing on skin absorption, scattering and autofluorescence properties, *2020 International Conference Laser Optics (ICLO)*, St. Petersburg, Russia, pp. 1-1, DOI: 10.1109/ICLO48556.2020.9285675 (Scopus, WoS)
5. S. Tran, **S. Zaytsev**, V. Charykova, M. Yusupova, A. Bashkatov, E. Genina, V. Tuchin, W. Blondel, M. Amouroux, (2020) Analysis of image features for the characterization of skin optical clearing kinetics performed on in vivo and ex vivo human skin using Linefield-Confocal Optical Coherence Tomography (LC-OCT), *Proc. SPIE*, Vol. 11553, p. 115532P, <https://doi.org/10.1117/12.2575173> (Scopus, WoS)
6. **S. M. Zaytsev**, W. Blondel, M. Amouroux, G. Khairallah, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, E. A. Genina, (2020) Optical spectroscopy as an effective tool for skin cancer features analysis: applicability investigation, *Proc. SPIE*, Vol. 11457, P. 1145706, <https://doi.org/10.1117/12.2564201> (Scopus, WoS)

7. V. D. Genin, P. Rakotomanga, **S. M. Zaytsev**, E. A. Genina, E. N. Lazareva, G. Khairallah, M. Amouroux, C. Soussen, H. Chen, W. Feng, D. Zhu, A. N. Bashkatov, W. Blondel, V. V. Tuchin, (2019) Research and development of effective optical technologies for diagnostics in dermatology, *Proc. SPIE*, Vol. 11065, P. 1106505, DOI: 10.1117/12.2528700 (Scopus, WoS)
8. **С. М. Зайцев**, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина, (2018) Оптическое просветление как способ увеличения глубины детектирования наночастиц в коже при ОКТ-визуализации, *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика* 18(4), 275-284, DOI: 10.18500/1817-3020-2018-18-4-275-284.

### Статьи в сборниках РИНЦ

1. В. Чарыкова, М. Юсупова, **С. М. Зайцев**, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина, (2020) Исследование влияния олеиновой и гиалуроновой кислот на оптическое просветление кожи человека *in vivo*, Сборник статей Всероссийской школы-семинара «Методы Компьютерной Диагностики в Биологии и Медицине 2020», С. 53-56.
2. В. В. Чарыкова, М. Юсупова, **С. М. Зайцев**, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина, (2020) Исследование влияния комплексного физико-химического воздействия на оптическое просветление кожи *in vivo*, сборник статей седьмой Всероссийской научной школы-семинара «Взаимодействие Сверхвысокочастотного, Терагерцового и Оптического Излучения с Полупроводниковыми Микро- и Наноструктурами, Метаматериалами и Биообъектами 2020», с. 93-97.
3. **С. М. Зайцев**, Ю. И. Свенская, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина, (2018) Оценка эффективности оптических просветляющих агентов при детектировании наноконтейнеров в коже с помощью ОКТ, Материалы пятой Всероссийской научной школы-семинара «Взаимодействие Сверхвысокочастотного, Терагерцового и Оптического Излучения с Полупроводниковыми Микро- и Наноструктурами, Метаматериалами и Биообъектами 2018», с. 90-92.

### Глава в монографии:

1. Walter Blondel, Marine Amouroux, **Sergey Zaytsev**, Elina Genina, Victor Colas, Christian Daul, Alexander Pravdin and Valery Tuchin, Human skin autofluorescence and optical clearing, Chapter 5 in *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging* (Edited by Valery Tuchin, Dan Zhu, Elina A. Genina), ISBN 9780367895099, **2022**.

## **Патент**

1. Ю. И. Свенская, Э. А. Генина, О. И. Гусякова, Б. В. Парахонский, Д. А. Горин, Г. Б. Сухоруков, В. В. Тучин, **С. М. Зайцев**, А. Н. Башкатов, Е. Е. Тальникова, А. Б. Бучарская, Г. С. Терентюк, С. Р. Утц, Способ трансдермальной доставки биологически активных веществ / Патент № 2633928, 19 Октября 2017 г.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация включает введение, обзорную главу, 4 главы с изложением полученных результатов, заключение, в котором обсуждаются результаты, подводятся итоги выполненной работы и даны перспективы развития. Материал изложен на 155 страницах печатного текста, содержит 5 таблиц и иллюстрирован 68 рисунками. Список литературы содержит 304 источника.

## ГЛАВА 1. Обзор литературы

### 1.1. Строение и оптические свойства кожи

Кожа является самым большим органом человеческого тела, занимая площадь около 2 м<sup>2</sup>. На кожу приходится около 15% общей массы тела [41]. Являясь интерфейсом между внутренней частью человеческого тела и окружающей средой, кожа выполняет естественную функцию физиологического барьера, защищая организм от ультрафиолетового (УФ) излучения, внешних физических воздействий и удерживая воду внутри тела [42]. Кожа состоит из трёх основных слоёв: эпидермис, дерма и жировая ткань (гиподерма). За счёт неоднородной структуры кожи её классифицируют, как сильно рассеивающую среду, так как взаимодействие света с ней носит сложный характер.

В целом, когда световое излучение проникает в биологические ткани через границу раздела воздух-ткань, часть излучения, падающая на границу, отражается, а оставшаяся часть излучения проникает в ткань. Когда излучение, прошедшее внутрь, распространяется через биологическую ткань, его интенсивность ослабляется за счёт механизмов поглощения и рассеяния. Оптической характеристикой биологической ткани, характеризующей её поглощение, является коэффициент поглощения биологической ткани  $\mu_a(\lambda)$ , определяющий долю потока излучения  $\Phi(\lambda)$ , поглощённого на единице пути  $L$  в поглощающей среде:  $\mu_a(\lambda) = -d\Phi(\lambda)/dL$  [30], [43]. Коэффициент рассеяния биологической ткани  $\mu_s(\lambda)$  – оптическая характеристика, определяющая ослабление коллимированного пучка излучения в процессе распространения через непоглощающую среду:  $T(\lambda) = \exp(-\mu_s(\lambda)L)$  [30], [35], [43]. Типичной единицей измерения двух данных коэффициентов является см<sup>-1</sup>. Зная оба этих коэффициента, можно рассчитать общий коэффициент ослабления света в среде, как [4]

$$\mu_t(\lambda) = \mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda). \quad (1)$$

При однократном акте упругого рассеяния фотон отклоняется от своего первоначального направления, на что влияют длина волны  $\lambda$  рассеянного фотона и размер рассеивателя в биологической ткани. В этом случае, средняя величина угла  $\theta$ , на которую направление движения фотона отклоняется при каждом акте рассеяния, определяет величину  $g$ , называемую фактором анизотропии рассеяния [30], [43], [44]. Данная величина принимает значения от -1 до 1, причём  $g=-1$  соответствует полному обратному рассеянию,  $g=0$  соответствует изотропному рассеянию (рассеяние Рэлея) а  $g=1$  соответствует рассеянию вперёд [30], [44], [45].

Коэффициент, определяющий направленность рассеянных фотонов, называется приведённым (транспортным) коэффициентом рассеяния, так как он учитывает такие оптические характеристики, как коэффициент рассеяния  $\mu_s(\lambda)$  и фактор анизотропии рассеяния  $g$ , и определяется по формуле [30], [44], [45]

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g). \quad (2)$$

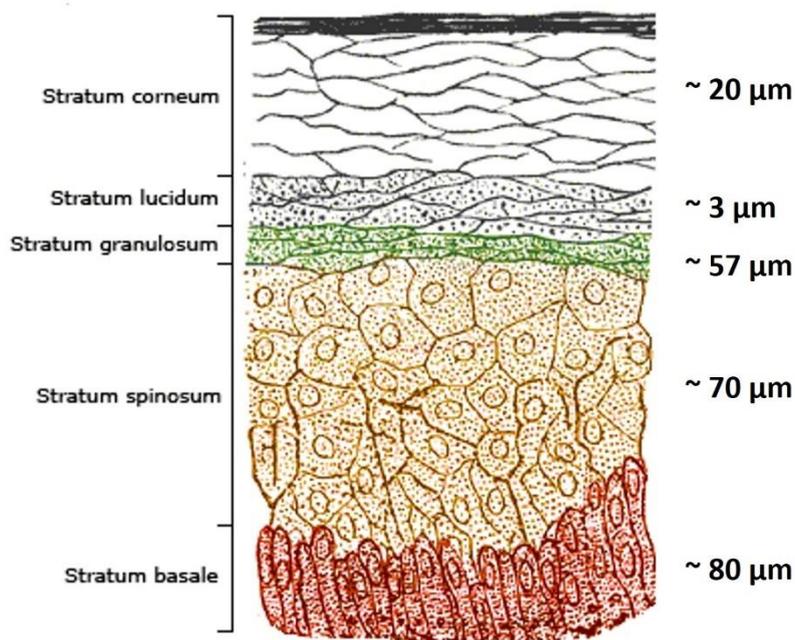
Ещё одним важным оптическим свойством биологических тканей является их показатель преломления (ПП), который позволяет определить скорость распространения излучения в среде, а также определить изменение его направления при прохождении через границу раздела сред. Показатель преломления определяется формулой

$$n = c/v, \quad (3)$$

где  $c$  – фазовая скорость света в вакууме а  $v$  – скорость света в биологической ткани [4], [35], [43].

### 1.1.1. Эпидермис

Эпидермис является наружным слоем кожи, выполняющим защитную функцию. Он относится к категории многослойных эпителиальных тканей. Толщина слоя человеческого эпидермиса в большинстве случаев варьируется в диапазоне 75-150 мкм, хотя в лицевой области его толщина составляет всего 20 мкм, а в подошвенных областях (ладони, стопы) она достигает вплоть до 5000 мкм [30], [46], [47]. Традиционно эпидермис можно поделить на 4 или 5 (Рисунок 1) слоёв (в зависимости от рассматриваемой области), которые, в свою очередь, подразделяются на живой и неживой эпидермис.



**Рисунок 1.** Схематическое представление структуры эпидермиса, отображающее соответствующие слои [48].

Наружным слоем эпидермиса является роговой слой (stratum corneum), чья средняя толщина составляет 20 мкм или 20 клеточных слоёв [46], [47]. Он является примером неживого слоя эпидермиса, так как состоит в основном из мёртвых, безъядерных кератиноцитов, превратившихся в плоские чешуйки. Межклеточный домен рогового слоя занимает липидный бислой, состоящий в основном из жирных кислот, холестерина и сфинголипидов. Данная

структура из кератиновых чешуек и липидного бислоя, названная в литературе “кирпич и раствор”, делает роговой слой плотной средой, затрудняющей диффузию внешних молекул в обе стороны [30], [46], [49], и, таким образом, представляющей собой защитный экран против химических и механических повреждений. Физико-химические барьерные свойства рогового слоя зависят от содержания воды в нём. Снабжение рогового слоя водой изнутри тела происходит за счет потовых желез и диффузии через насыщенные водой подлежащие ткани. Наружные клеточные слои рогового слоя находятся в равновесии по содержанию воды с окружающей средой, а глубокие слои рогового слоя находятся в равновесии с соседними живыми слоями эпидермиса, которые хорошо гидратированы. В связи с этим, в роговом слое присутствует градиент концентрации воды, ответственный за трансэпидермальную потерю воды [30].

Следующим слоем является блестящий слой (*stratum lucidum*). Он встречается под роговым слоем только в областях ладоней и стоп, и вместе с остальными четырьмя слоями формирует так называемую «толстую кожу». Обычно, он состоит из 3-5 слоёв мертвых кератиноцитов, которые заполнены элеидином, промежуточной формой кератина [30].

Под роговым слоем (или под блестящим слоем, в случае ладоней и стоп) располагается зернистый слой (*stratum granulosum*). Это поверхностный слой так называемого живого эпидермиса. Его средняя толщина составляет ~57 мкм [47]. Он состоит из кератиноцитов, содержащих гранулы кератогиалина. На границе с роговым слоем эти клетки выделяют в межклеточное пространство пластинчатые тельца, богатые белками и липидами, теряя при этом свои ядра и органеллы. В последующем это приводит к соответствующему образованию отмерших кератиновых чешуек и липидного бислоя в роговом слое эпидермиса.

Ниже, между зернистым слоем и базальным слоем, располагается шиповидный слой (*stratum spinosum*) – слой эпидермиса, в котором начинает происходить активное ороговение многогранных кератиноцитов. Этот слой также содержит клетки Лангерганса, которые участвуют в функционировании иммунной системы. Толщина данного слоя составляет примерно 70 мкм [47].

На границе с дермой, будучи отделенным от неё базальной мембраной, находится самый нижний прорастающий слой эпидермиса - базальный слой (*stratum basale*), состоящий из одного слоя столбчатых базальных клеток. Его средняя толщина составляет 80 мкм [47]. В этом слое некоторыми из базальных клеток осуществляется деление, с которого начинается весь процесс образования кератиноцитов и последующей кератинизации эпидермиса. Этот процесс продолжается постоянно и определяет обновление эпидермиса человека.

Два нижних слоя эпидермиса также содержат меланоциты – клетки, вырабатывающие пигмент меланин. Содержащийся в меланосомах, он транспортируется через отростки

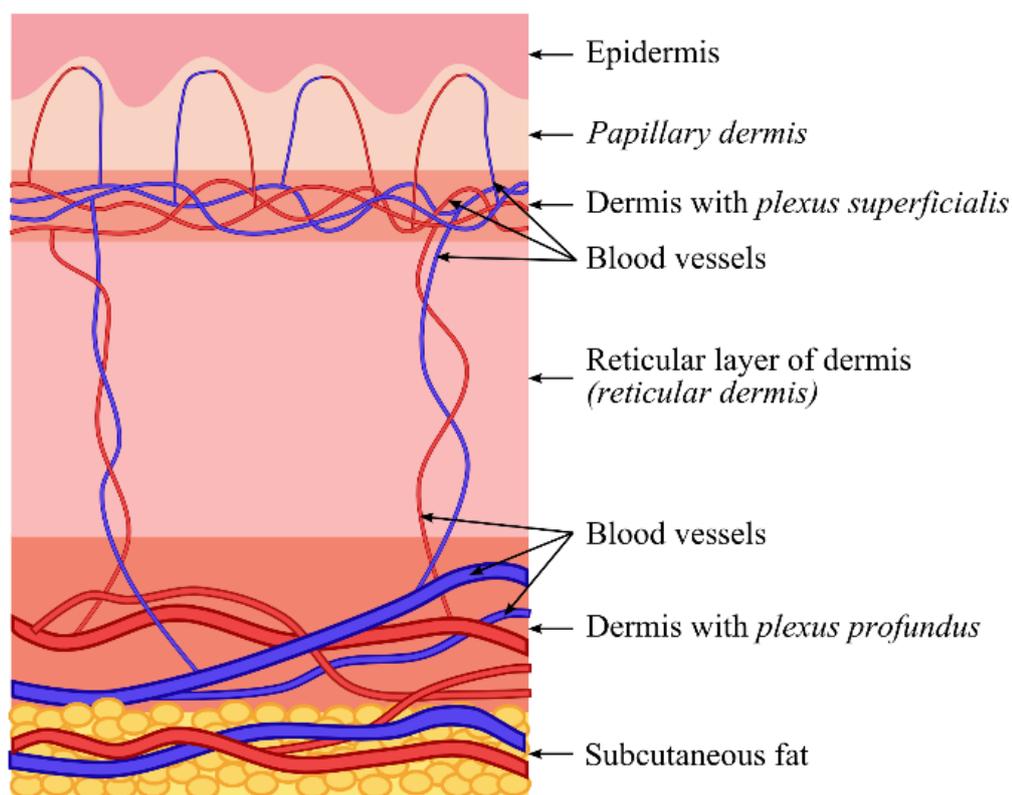
меланоцитов к эпидермальным кератиноцитам, где защищает их от повреждающего воздействия УФ-излучения. Содержание меланина в коже определяет ее пигментацию, разделяемую для практических целей по шкале Фитцпатрика на шесть фототипов от первого, т.е. самого светлого (кельтского), соответствующего людям, приспособленным к среде с низким уровнем УФ-излучения, до шестого (африканского), т.е. самого темного, соответствующего людям с наибольшей устойчивостью к воздействию УФ-излучения, почти не имеющим шансов получить солнечный ожог [30].

Меланин – один из основных компонентов кожи, определяющий ее поглощающие свойства. Он поглощает проходящее через эпидермальный слой излучение практически во всем видимом спектральном диапазоне, с усилением поглощения при смещении в коротковолновую область видимого спектра [30], [35]. Коэффициенты поглощения  $\mu_a(\lambda)$ , полученные с помощью инверсного метода Монте-Карло (МК) и интегрирующей сферы для слоя эпидермиса толщиной 100 мкм на длинах волн 337 нм, 577 нм и 633 нм, составили, соответственно,  $32 \text{ см}^{-1}$ ,  $10.7 \text{ см}^{-1}$  и  $4.3 \text{ см}^{-1}$  [43], [50].

Коэффициенты рассеяния  $\mu_s(\lambda)$  эпидермиса значительно превышают поглощение. На длинах волн 337 нм, 577 нм и 633 нм они составляют  $165 \text{ см}^{-1}$ ,  $120 \text{ см}^{-1}$  and  $107 \text{ см}^{-1}$ , соответственно [43]. Основной вклад в рассеивание эпидермиса вносит оптическая неоднородность, вызванная разницей в показателях преломления между основными структурными компонентами эпидермиса (рассеивателями) и окружающей жидкостью, такой как клеточная цитоплазма или интерстициальная жидкость (Interstitial fluid - ISF), в основном состоящая из воды с небольшим количеством растворенных солей [51], [52]. Кроме того, неживой эпидермис и остальные слои эпидермиса различаются по суммарному показателю преломления в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах длин волн (1.5-1.55 для рогового слоя против 1.34-1.39 для живого эпидермиса) [35], [53], [54]. Это вызвано несколькими факторами, основными из которых являются различия в структуре каждого слоя, а также неравномерное распределение концентрации воды между слоями эпидермиса [30], [55].

### *1.1.2. Дерма*

Дерма представляет собой слой фиброзной соединительной ткани кожи, расположенной под эпидермисом (Рисунок 2). Она выполняет в основном трофическую и опорную функции, что определяет её строение. Основными компонентами дермы являются структурные белки в виде волокон (поэтому ее относят к фиброзным тканям) - эластин и, главным образом, коллаген. Межволоконное пространство заполнено основным веществом, состоящим из воды и растворенных в ней солей. Объемная доля воды в дерме составляет ~70% [30], [35], [56], [57].



**Рисунок 2.** Схематическое представление слоёв кожи [47].

Дерма подразделяется на два слоя. Первый слой – сосочковая дерма (papillary dermis). Она связана с эпидермисом базальной мембраной и названа так из-за выпячиваний, называемых сосочками, которые способствуют трофике эпидермиса за счет большой площади соприкосновения с ним. В этом слое располагаются терминальные кровеносные капилляры и лимфатические сплетения, отходящие соответственно от артериол, образующих субпапиллярную (поверхностную) артериальную сеть в нижней части этого слоя, и от поверхностного лимфатического сплетения, лежащего ниже поверхностной артериальной сети. Структура коллагеновых волокон в этом слое в основном тонкая (около 60 нм в диаметре [30]) и рыхлая. Средняя толщина данного слоя составляет около 100 мкм [35].

Ретикулярная дерма (reticular dermis) – это нижний отдел дермы, плавно переходящий в гиподерму. Обычно он намного толще, чем расположенная выше сосочковая дерма (1–2 мм) [35], [58]. Он характеризуется как плотная соединительная ткань неправильной формы, содержащая упорядоченные пучки коллагеновых волокон, что и отражено в его названии. Эластиновые волокна располагаются преимущественно в этом слое в виде сети [59]. Ретикулярная дерма выполняет эластичные свойства, придавая коже упругость. На большинстве участков тела человека в этом слое берут начало потовые и сальные железы кожи, а также волосные фолликулы [35]. На границе с жировой тканью имеется глубокая кожная

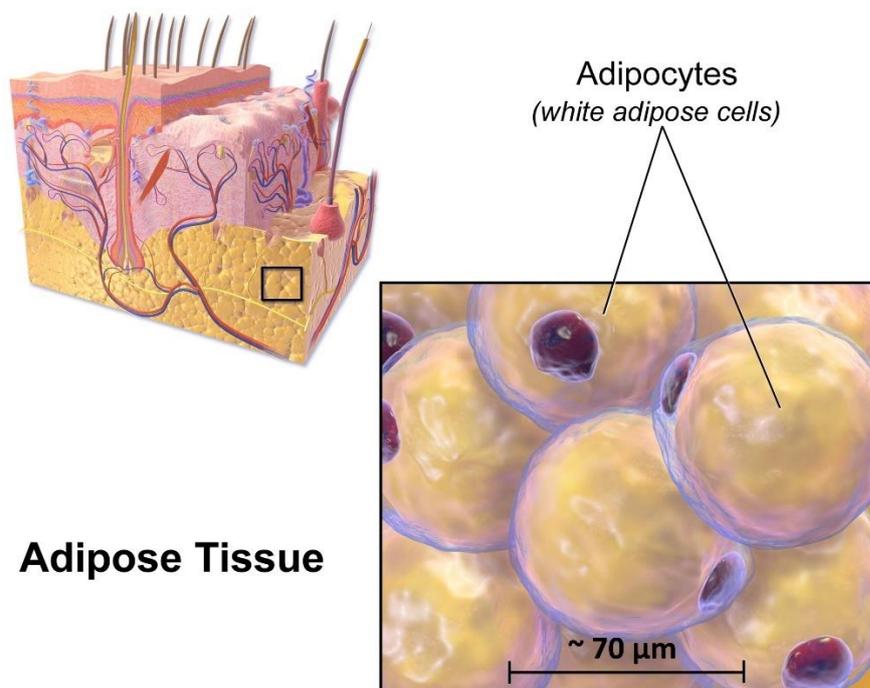
артериальная сеть, соединенная с поверхностной артериальной сетью «ветвями», проникающими в ретикулярную дерму [30], [47], [58].

Кровь, содержащаяся в дерме, определяет её поглощающие свойства, так же как меланин в эпидермисе. Основными компонентами крови, поглощающими видимый свет, являются гемоглобин, билирубин и  $\beta$ -каротин [35]. Коэффициенты поглощения  $\mu_a(\lambda)$  (полученные инверсным методом МК) для слоя дермы толщиной 200 мкм на длинах волн 337 нм, 577 нм и 633 нм, составляют  $23 \text{ см}^{-1}$ ,  $3 \text{ см}^{-1}$  и  $2.7 \text{ см}^{-1}$ , соответственно [43], [50]. В то же время, при смещении в инфракрасную область спектра наблюдается поглощение воды, которая содержится в больших объёмах в данном слое кожи.

Коллагеновые волокна являются основными компонентами кожи, определяющими ее рассеивающие свойства. Коэффициенты рассеяния  $\mu_s(\lambda)$  дермы, полученные с использованием инверсного метода МК на длинах волн 337 нм, 577 нм и 633 нм, составили  $227 \text{ см}^{-1}$ ,  $205 \text{ см}^{-1}$  и  $187 \text{ см}^{-1}$ , соответственно [43]. Столь большие значения можно объяснить тем, что на коллагеновых волокнах и их пучках происходит рассеяние света из-за большой разницы в ПП между коллагеном и окружающей жидкостью, состоящей в основном из воды. Наблюдается также зависимость характера рассеяния от степени упорядоченности и размеров коллагеновых волокон. Например, папиллярная дерма характеризуется сильным обратным рассеянием из-за малых размеров содержащихся в ней коллагеновых волокон по сравнению с длинами волн видимого диапазона ( $d < \lambda$ ). В ретикулярной дерме из-за относительно большого размера пучков коллагена имеет место сильное рассеяние вперед [35], [60]. Показатель преломления дермы в ближнем инфракрасном (БИК) и видимом диапазоне длин волн составляет примерно 1,4 [54].

### *1.1.3. Гиподерма*

Жировая ткань, или гиподерма, представляет собой самый нижний слой кожи человека, прикрепленный фиброзными связками к глубокой фасции [61]. Она состоит из рыхлой соединительной ткани, а также клеток фибробластов, макрофагов и (преимущественно) адипоцитов (Рисунок 3). Этот слой содержит кровеносные сосуды, а также железистые части некоторых потовых желез и корни волосных фолликулов [30].



## Adipose Tissue

Рисунок 3. Микроанатомия подкожного жира [62].

Подкожный жир, представленный в гиподерме адипоцитами, является ее наиболее распространенным слоем [63]. Он состоит из адипоцитов, сгруппированных в дольки, которые окружены соединительной тканью, выполняющей опорную роль [47]. Жир в виде триглицеридов занимает почти весь объем адипоцитов, а их клеточные ядра имеют относительно небольшие размеры и располагаются по краю клетки [47]. Эти клетки относительно большого размера (20-120 мкм) служат для запасания энергии и выполняют терморегуляторную функцию. Пространство между клетками занято интерстициальной жидкостью, капиллярами и нервными волокнами [47]. Недавно было продемонстрировано, что врожденное расположение отдельных адипоцитов может действовать как каскад квазиупорядоченных микролинз, ограничивающих распространение света внутри жировой ткани, как в линзовых световодах [64].

Поглощение света гиподермой определяется находящимися в ней водой и липидами, а также элементами крови, содержащимися в сосудах (гемоглобин, билирубин,  $\beta$ -каротин) [30], [35]. На длине волны 633 нм коэффициент поглощения гиподермы, измеренный спектрофотометром с интегрирующей сферой, составил  $1.4 \pm 0.3 \text{ см}^{-1}$  [65] при  $g=0.8$ . Рассеяние в гиподерме происходит в основном на липидных каплях, равномерно распределенных в адипоцитах. Приведенный коэффициент рассеяния гиподермы, рассчитанный в этой же работе, составил  $2.54 \pm 0.3 \text{ см}^{-1}$  при  $g=0.8$ . Показатель преломления жировой ткани в ближнем ИК и видимом диапазонах длин волн составляет примерно 1.44–1.45 [66], [67].

#### 1.1.4. Ограничения применения оптических методов

Общие оптические свойства кожи, как неоднородной среды, представляют собой совокупность локальных оптических свойств отдельных ее компонентов, образующих слои различного строения [30]. Оптические свойства, в свою очередь, напрямую зависят от длины волны  $\lambda$  излучения. Следовательно, возможность использования неинвазивных или малоинвазивных оптических методов исследования кожи связана с необходимостью учета специфических полос поглощения определенных кожных хромофоров, таких как, например, меланин, гемоглобин, вода и липиды [30], [35], [68], [69]. Также, в разделах выше было показано, что коэффициент рассеяния слоёв кожи  $\mu_s(\lambda)$  значительно превосходит по величине коэффициент поглощения  $\mu_a(\lambda)$ . Коэффициент рассеяния обратно зависит от длины волны  $\lambda$  в видимом и ближнем ИК диапазонах спектра [43]. Одной из важных оптических характеристик является глубина проникновения света в биоткань  $\delta$ . Она отражает, насколько глубоко свет определенной  $\lambda$  может проникнуть в среду до того, как его интенсивность снизится до 37% от начальной интенсивности из-за потерь, связанных с поглощением и рассеянием [30], [43]. В диффузном приближении эта величина обратна эффективному коэффициенту экстинкции  $\mu_{eff}$ , выражаемому как [70], [71]

$$\delta = \frac{1}{\mu_{eff}} = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}}. \quad (3)$$

Для увеличения глубины проникновения света из-за полос поглощения некоторых компонентов биологической ткани оптические методы требуют использования определенных длин волн видимого и ближнего инфракрасного диапазонов. В настоящее время получено много данных об оптических свойствах крови и различных биологических тканей, и в связи с наличием локальных максимумов в  $\delta$ , связанных со спектрами поглощения и рассеяния, для целей диагностики и терапии были предложены пять так называемых «диагностических окон», представляющих собой следующие диапазоны длин волн [72]: 350-400 нм, 625-975 нм, 1100-1350 нм, 1600-1870 нм и 2100-2300 нм.

Однако даже в пределах этих диагностических диапазонов кожа по-прежнему обладает сильными рассеивающими свойствами. Это приводит к относительно низкому разрешению по глубине и контрасту, а полный потенциал оптических методов ограничивается получением изображений или спектров только из верхних слоев биологических тканей. Это основное ограничение использования оптических методов в диагностике и терапии [30].

## 1.2. Оптические методы диагностики кожи

В течение многих лет основным методом диагностики кожных заболеваний в клинических условиях был визуальный осмотр, проводимый врачом-дерматологом, что требовало специальной подготовки и опыта, но в то же время не лишало этот метод определенного субъективизма [73]. Для получения информации о биохимическом составе кожи, например, для дифференциации рака кожи и доброкачественных образований, необходимо было использовать такие золотые стандарты, как гистологическое исследование и биопсия. Очевидными недостатками данного подхода являются инвазивность, невозможность получения результатов в короткие сроки *in situ* и ненадежность, так как образцы, взятые для исследования, могли быть испорчены в процессе подготовки.

Развитие технологий в области оптики, такое как приход лазеров на рынок, а также развитие компьютерных технологий, привело к появлению большого количества оптических методов, многие из которых быстро нашли свое применение в медицинской диагностике [7], [30]. Среди них флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия диффузного отражения, рамановская спектроскопия, конфокальная микроскопия, мультифотонная спектроскопия, микроскопия генерации второй гармоники, оптическая когерентная томография, гиперспектральная визуализация. Их общими преимуществами являются относительная компактность (возможность использовать оптические методы в клиниках), быстрота получения результатов, а также неинвазивность в сочетании с использованием безопасных диапазонов электромагнитного излучения. В данном подразделе будут рассмотрены некоторые оптические методы визуализации и спектроскопии (флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия диффузного отражения и оптическая когерентная томография), нашедшие применение в современной диагностике кожи, приведены их преимущества и недостатки, а также показаны примеры комбинированного использования нескольких оптических методов, усиливающих преимущества и компенсирующих недостатки друг друга.

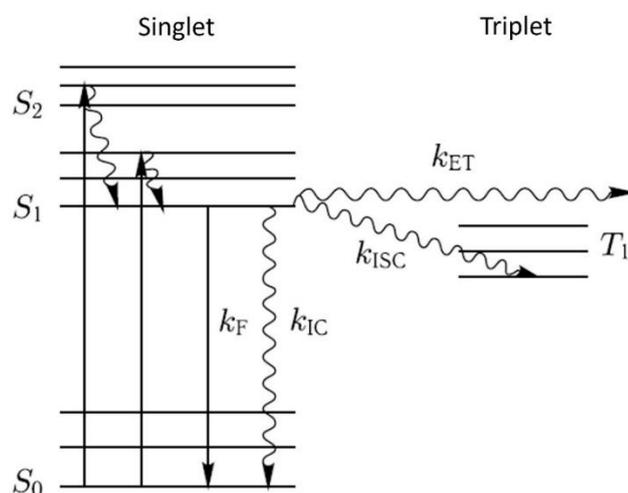
### 1.2.1. Спектральные методы

Методы оптической спектроскопии дают возможность определения оптических параметров кожи, таких как, например, рассеяние и поглощение, в УФ, видимом и ближнем ИК диапазонах. Эти методы, при использовании *in vivo*, в основном основаны на использовании волоконно-оптических зондов, что удобно для измерений на любом участке тела. Как было описано в предыдущем разделе, кожа является неоднородным по своей структуре органом и обладает рассеивающими и поглощающими свойствами, которые определяются входящими в состав элементов кожи веществами, такими как гемоглобин, меланин, вода, липиды, коллаген, эластин и кератин [30]. Путем сравнения спектров, полученных на участке кожи, вызывающем

сомнения у специалиста, со спектрами, зарегистрированными на здоровой коже (так называемые референсные спектры), становится возможным определение вида новообразования в зависимости от изменения концентрации конкретного компонента [22], [74]–[76].

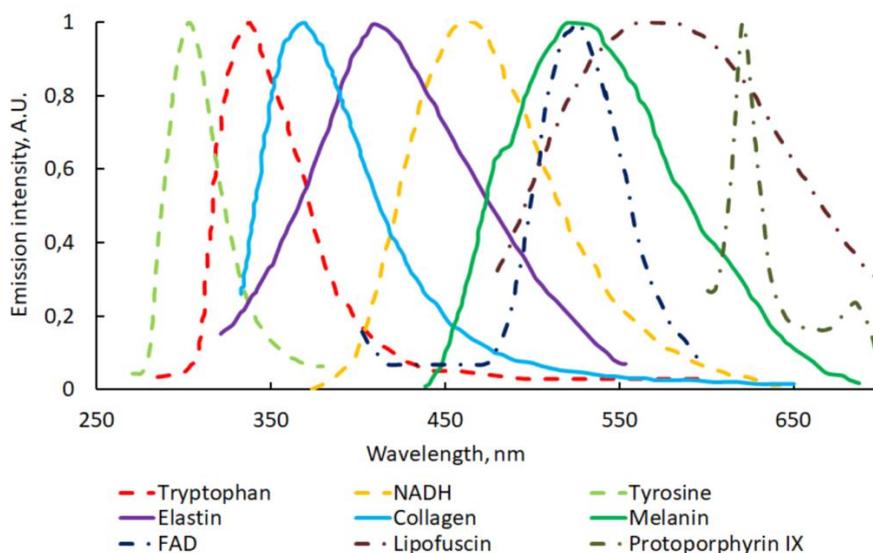
### Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресцентная спектроскопия активно используется для спектрального анализа биотканей в течение многих лет [77]–[84]. В её основе лежит явление флуоресценции — испускание фотонов молекулами в возбужденном состоянии (флуорофорами). Когда флуорофор поглощает фотон падающего излучения (обычно ультрафиолетового или видимого диапазона), энергия поглощенного фотона заставляет молекулу переходить из основного состояния в одно из возбужденных синглетных электронных состояний,  $S_1$  или  $S_2$  [30]. Из этого состояния возможен переход обратно в основное состояние за счет излучательных (флуоресценция ( $k_f$ ) или фосфоресценция) или безызлучательных процессов (безызлучательная релаксация или внутренняя конверсия ( $k_{IC}$ )) (Рисунок 4). При переходе в основное состояние из-за флуоресценции молекула испускает фотон, энергия которого меньше энергии поглощенного фотона и связана с разницей в энергии двух электронных состояний молекулы и с тепловыми потерями поглощенной молекулой энергии. Таким образом, длина волны  $\lambda_{em}$  испускаемого фотона выше, чем поглощённого ( $\lambda_{exc}$ ). Интенсивность флуоресцентного излучения пропорциональна интенсивности падающего на кожу излучения. В качестве источников света для флуоресцентной спектроскопии используется как низкокогерентный свет (ксеноновые лампы), так и высококогерентное лазерное излучение [30], [85], [86]. Датчики для флуоресцентной спектроскопии обычно выполнены в волоконной конфигурации, что позволяет легко определять характеристики любого участка кожи.

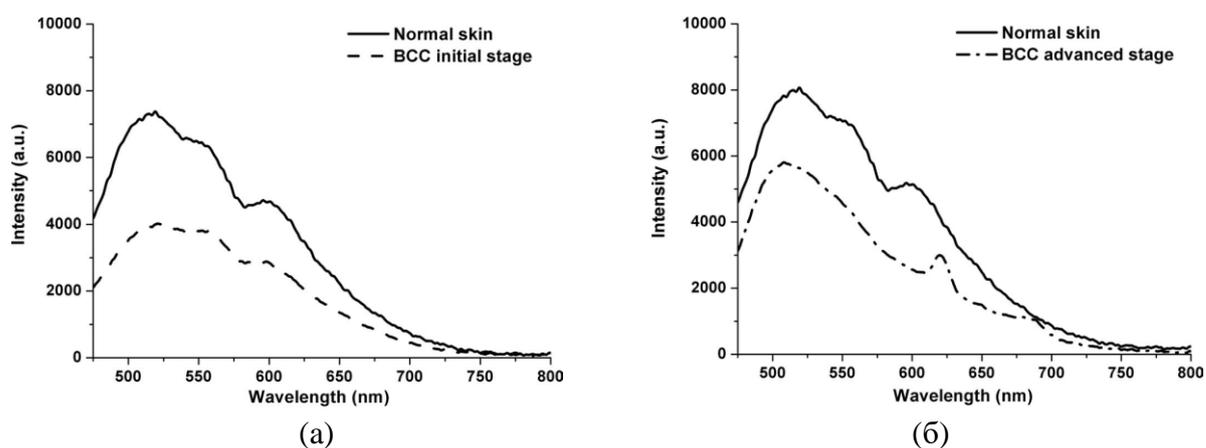


**Рисунок 4.** Диаграмма Яблонского энергетических уровней молекул и виды переходов. Прямые линии — излучательные переходы, волнистые линии — безызлучательные переходы [30].

Кожа содержит несколько естественных флуорофоров, находящихся в различных слоях. В общем случае, эпидермальные и дермальные флуорофоры различаются по своим спектральным признакам. Примерно на длине волны 315 нм расположена область разграничения спектральных «маркерных» областей данных флуорофоров [84]. Основными флуорофорами кожи (Рисунок 5), которые принято считать внутренними биомаркерами патологических процессов, являются продукты метаболизма (триптофан, NADH, FAD, порфирины) кожи и вещества (кератин, коллаген, эластин), образующие ее структурные компоненты [76]. Различные патологические процессы в организме приводят не только к изменению структуры кожи, но и к биохимическим изменениям, сопровождающимся вариациями флуоресцентного сигнала того или иного биомаркера. Эффективность флуоресцентной спектроскопии, которая специализируется на анализе внутренних биомаркеров кожи (так называемая автофлуоресцентная спектроскопия - АФС), показана во многих работах [21], [22], [75], [76], [87]–[91]. Например, в некоторых исследованиях показано, что при сравнении спектров автофлуоресценции (АФ) здоровой кожи и кожи с БКК в спектрах БКК наблюдаются ярко выраженные пики на длинах волн 620 и 680 нм, соответствующие протопорфиру IX (Рисунок 6) [89], [92]. Анализ спектров АФ *in vivo*, проведенный в различных исследованиях БКК [89], [92]–[96], плоскоклеточного рака [94], [95] и меланомы [97] показал, что при использовании длин волн возбуждения в диапазоне 337–442 нм наблюдаются стойкие результаты, свидетельствующие о снижении сигнала флуоресценции патологически измененных участков по сравнению со здоровой кожей. Наиболее сильные различия обнаружены в диапазоне длин волн 370–395 нм между спектрами интенсивности автофлуоресценции БКК и здоровой кожи.



**Рисунок 5.** Спектры, использованные для моделирования флуоресценции кожи методом Монте-Карло [98].



**Рисунок 6.** Сравнение спектров флуоресценции (длина волны возбуждающего излучения – 405 нм) здоровой кожи со спектрами (а) кожи в начальной стадии БКК и (б) двухлетней БКК [89].

Основными недостатками АФС являются низкая интенсивность излучения эндогенных флуорофоров, высокая чувствительность флуоресцентного сигнала к внутренним факторам (рН и температура), большое физиологическое разнообразие между разными участками кожи одного и того же пациента и между пациентами, а также сложность в различении спектральных вкладов отдельных флуорофоров в сигнал АФ из-за сильного спектрального перекрытия их спектров возбуждения и испускания [30]. Из-за сильного рассеяния света кожей глубина проникновения длин волн  $\lambda_{exc}$ , используемых в основном в АФС, не превышает 1 мм [85].

Интенсивность флуоресценции кожи можно повысить с помощью экзогенных флуорофоров, которые могут аккумулироваться в поражённых клетках (преимущественно раковых) и служить маркерами наличия определенных заболеваний, проявляя характерные для них высокоинтенсивные пики в спектрах флуоресценции. Этот метод флуоресценции называется «drug-induced fluorescence spectroscopy» (DFS). Клинические исследования показали, что DFS имеет определенное преимущество перед автофлуоресцентной спектроскопией, в основном за счёт высокой интенсивности экзогенных флуорофоров. Однако выбор подходящего флуорофора, время накопления флуорофора в поражённых участках ткани и возможные побочные эффекты применения экзогенного вещества вкупе с необходимостью документального разрешения на его использование являются основными ограничениями метода DFS.

Преимущества использования DFS по сравнению с гистологией для раннего выявления немеланомного рака кожи вызывает споры. С одной стороны, в некоторых исследованиях сообщается о высокой чувствительности и специфичности метода [99], [100], с другой стороны, некоторые научные группы сообщали об отсутствии потенциала DFS при ранней диагностике предраковых изменений кожи [101], [102].

Несмотря на очевидные недостатки, получение информации о биохимическом строении кожи в режиме реального времени, предлагаемое методом флуоресцентной спектроскопии, делает этот метод привлекательным для клинической диагностики заболеваний кожи.

### Спектроскопия диффузного отражения

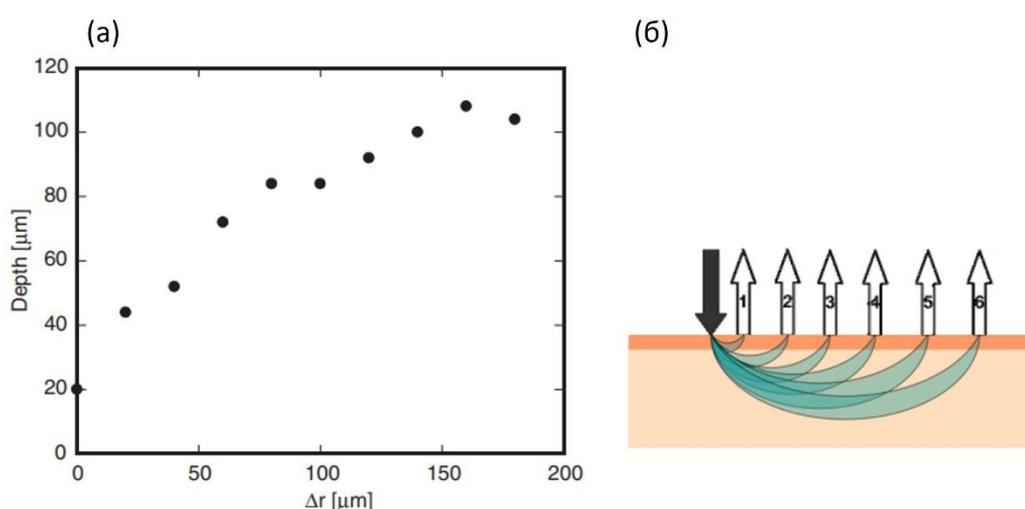
Первые работы, экспериментально продемонстрировавшие эффективность спектроскопии диффузного отражения (ДО) для спектральной диагностики кожи, появились еще в 1939 году [103]. С тех пор экспериментальная установка претерпела значительные изменения, направленные на повышение ее портативности за счет использования небольшого спектрометра, подключенного к компьютеру, и источника света. Волоконно-оптический зонд, который используется в современных версиях для доставки падающего излучения на кожу и регистрации отраженного света, позволяет проводить измерения в любой геометрии с различных участков кожи *in vivo* [41]. Только 4% падающего излучения отражается непосредственно поверхностью кожи. Основная доля излучения распространяется в коже на глубину до 1 мм, где в результате процессов рассеяния и поглощения разными слоями и соответствующими компонентами кожи формируется диффузно отражённый (рассеянный) биотканью свет, несущий информацию о биохимическом составе кожи. Глубина проникновения света в ткань  $\delta$  зависит от поглощения и рассеяния ткани. Диффузное отражение регистрируется волоконным зондом [41], [85]. Предполагается, что конфигурация волоконного зонда, в частности, расстояние между испускающим и регистрирующим волокнами, также влияет на глубину, с которой происходит регистрация излучения. Информация о зондируемой глубине в таком случае важна для интерпретации полученных результатов. Для математического описания распространения света в биоткани используется стационарное уравнение теории переноса излучения. Однако оно не имеет аналитического решения [30]. Для аналитического решения, это уравнение упрощается с помощью диффузионного приближения, накладывающего определённые условия. Рассеяние в таком случае полагают значительно большим, нежели поглощение, расстояние между источником и приёмником – значительно больше средней транспортной длины пробега фотона, а точечный пучок исследуемого излучения падает на биоткань по нормали.

Для более полного, чем при использовании диффузионного приближения, описания распространения света в биоткани было предложено статистическое моделирование с помощью стохастических моделей. Они подразумевают, что ожидаемое значение случайной переменной эквивалентно физической величине. Одним из таких методов является моделирование методом Монте-Карло [30]. В общем для этого метода случае, для численного решения уравнения переноса излучения, огромное количество (1-100 млн) пакетов фотонов, чей начальный «вес»

равен единице, запускается в моделируемую среду, состоящую из одного или нескольких слоёв, чьи параметры (поглощение, рассеяние, толщина) заданы заранее. Для моделирования движения такого числа фотонов в среде требуются большие вычислительные мощности. После определения геометрии ввода фотонов в среду случайно выбирается величина шага моделирования по формуле

$$l = \frac{-\ln \xi}{\mu_a + \mu_s}, \quad (4)$$

где  $\xi$  – случайное число, равномерно распределённое в интервале от 0 до 1. Далее, положение фотона обновляется и он снова испытывает рассеяние, при котором направление выбирается на основе функции Хеньи-Гринштейна [30]. Затем процедура повторяется. При попытке фотона покинуть среду, вероятность внутреннего отражения рассчитывается по формулам Френеля. При каждом шаге фотон теряет часть своего «веса». Эта потеря определяется произведением «веса» в начале шага и  $(1 - \mu_s/\mu_t)$ . Фотон с оставшимся весом снова испытывает рассеяние, пока не наступит одно из условий так называемой «смерти фотона», представляющих собой либо достижение детектора, либо поглощение, либо выход за пределы области без регистрации детектором. В итоге, данный метод моделирования позволяет, например, оценить распределение глубины проникновения света в биоткань в зависимости от расстояния источник-приёмник (Рисунок 7). Как было продемонстрировано в литературе [104], [105], совокупность наиболее вероятных траекторий фотонов между источником и приёмником обладает формой «банана», и зависит как от параметров источника и детектора (расстояние, числовая апертура), так и от коэффициентов рассеяния и поглощения, а также от фазовой функции рассеяния (фактор анизотропии рассеяния  $g$ ).



**Рисунок 7.** (а) Иллюстративная зависимость измеряемой глубины от расстояния источник-приёмник [104] и (б) схематическое изображение траекторий фотонов в форме «банана» для разных расстояний источник-приёмник [105], полученные с помощью метода Монте-Карло.

Таким образом, зарегистрированные спектры ДО содержат характерные участки (полосы), образованные наличием в коже различных хромофоров. Основные хромофоры кожи показаны в Таблице 1.

**Таблица 1.** Основные хромофоры кожи в видимом и ближнем ИК диапазонах. Данные взяты из [85].

Хромофор	Полосы поглощения (нм)	Параметр кожи
Оксигемоглобин	412, 542, 577	Капиллярная и артериолярная кровь
Дезоксигемоглобин	430, 555, 753	Венозная кровь
Меланин	Нет пиков, монотонное уменьшение в сторону более длинных волн	Пигментация кожи
Вода	760, БИК-диапазоны	Интерстициальная жидкость, отек

Использование спектроскопии ДО для диагностики кожи основано на анализе изменений спектров ДО, возникающих в результате структурных изменений на клеточном и субклеточном уровнях, индуцированных патологическими процессами. Использование описанного выше диффузионного приближения, различных численных методов (МК), а также использование спектров поглощения чистых компонентов [106]–[110] позволяет получить информацию о присутствии тех или иных внутренних хромофоров (Рисунок 8), что вместе со структурной информацией делает спектроскопию диффузного отражения подходящим методом анализа для раннего выявления патологических процессов в коже.

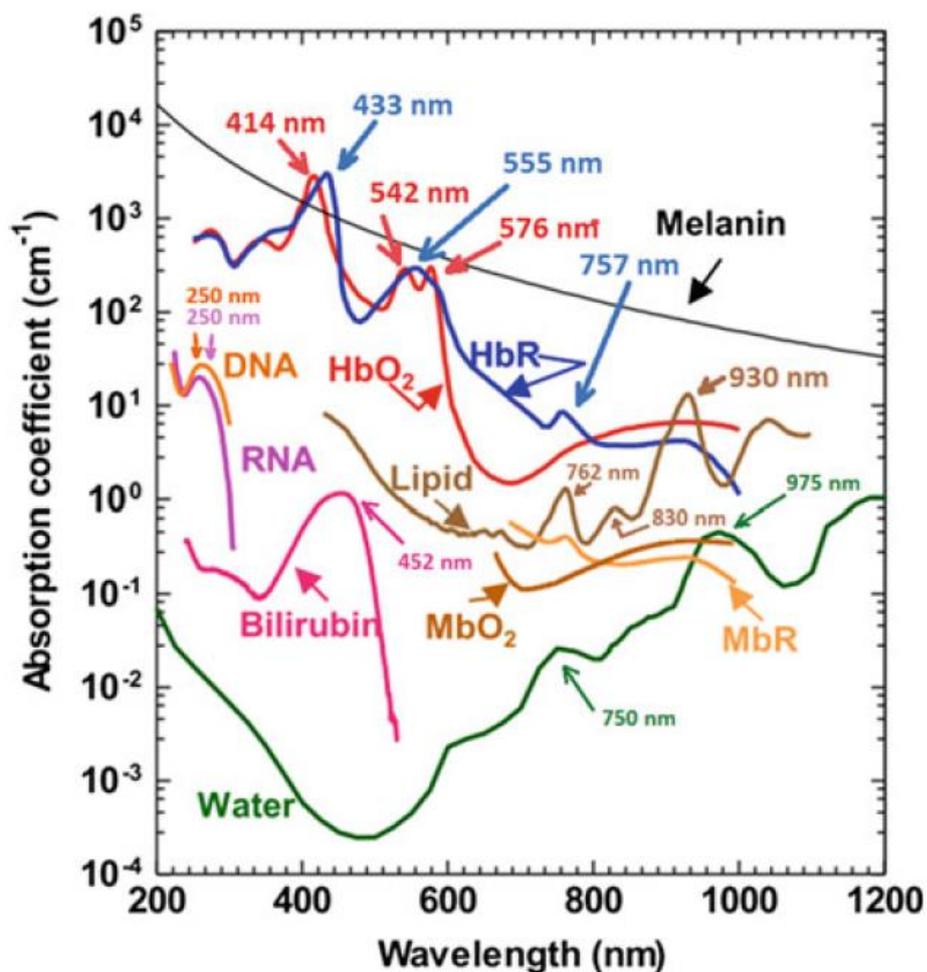
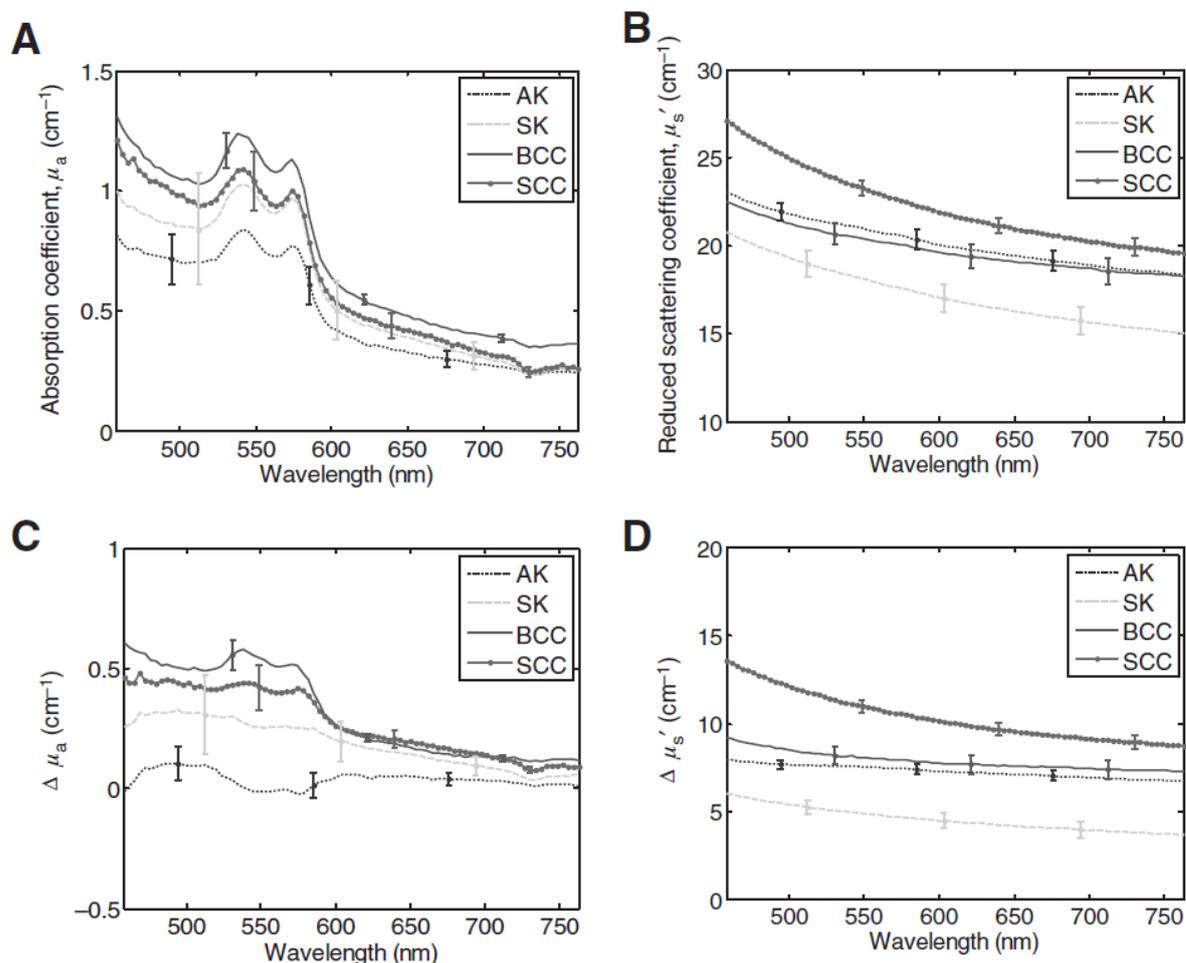


Рисунок 8. Спектры поглощения различных компонентов кожи и других биологических тканей [43].

В работах, проведенных в конце прошлого века, была показана возможность определения спектральных особенностей различных факультативных пигментаций, что затруднительно осуществить при визуальном осмотре и требуемом ранее гистологическом анализе [111]–[115]. При анализе спектров диффузного отражения выяснилось, что эпидермальная пигментация, вызванная ультрафиолетовым и солнечным излучением, отличается от естественной пигментации. Например, спектры кожи, индуцированные UVB-излучением, отличаются от спектров конститутивной (естественной) пигментации в области коротких волн (<335 нм), а пигмент, вызванный UVA-излучением, демонстрирует существенные отличия от конститутивной пигментации в видимой части спектра.

В последние годы спектроскопия диффузного отражения активно используется для дифференциации здоровой и раковой кожи, а также кожи, подверженной предраковым изменениям. Полученные значения специфичности и чувствительности варьировались в среднем для разных групп исследователей в пределах 72-92% и 64-92%, соответственно. Эти значения напрямую зависят от различных спектральных характеристик, таких как интегральная

величина коэффициента поглощения и приведенного коэффициента рассеяния (Рисунок 9) [116], [117], общий наклон спектральной кривой [118] или интегральное значение величины диффузного отражения в конкретных областях спектра [119]–[121], рассчитанное для здоровых и пораженных участков кожи.



**Рисунок 9.** Усреднённые спектры коэффициента поглощения (а), усреднённые спектры приведенного коэффициента рассеяния (б), усреднённые спектры дифференциального коэффициента поглощения (с) и усреднённые спектры дифференциального приведенного коэффициента рассеяния (д) для плоскоклеточного рака (SCC), БКК (BCC), актинического кератоза (AK) и себорейного кератоза (SK). Столбики погрешностей представляют собой стандартные ошибки среднего [117].

Таким образом, среди преимуществ спектроскопии ДО можно выделить скорость, точность и неинвазивность диагностики структурно-биохимического состава кожи. Соответственно, эта методика значительно превосходит аналитические возможности человеческого глаза, обладая высокой чувствительностью и специфичностью при дифференциальном анализе патологических процессов, а, следовательно, позволяет исключить инвазивные гистологические методы анализа. Основным недостатком спектроскопии ДО является малая (до 1 мм) глубина проникновения падающего излучения, обусловленная сильным рассеянием верхних слоев кожи.

### *1.2.2. Методы визуализации*

В отличие от спектральных методов, методы визуализации не направлены на получение информации о биохимическом составе исследуемой биологической ткани. Они позволяют получать изображения исследуемых структур в режиме реального времени, что является несомненным преимуществом при клинической дифференциации патологических образований кожи. Недостатками традиционных методов, таких как визуальный осмотр у дерматолога или гистологическое исследование, являются либо ограниченность анализа поверхностью кожи, либо инвазивный характер процесса взятия образца для последующей визуализации. Неинвазивность визуализации структуры кожи по глубине является очевидным преимуществом методов оптической визуализации, что обусловило их исследования в этом направлении.

#### *Оптическая когерентная томография*

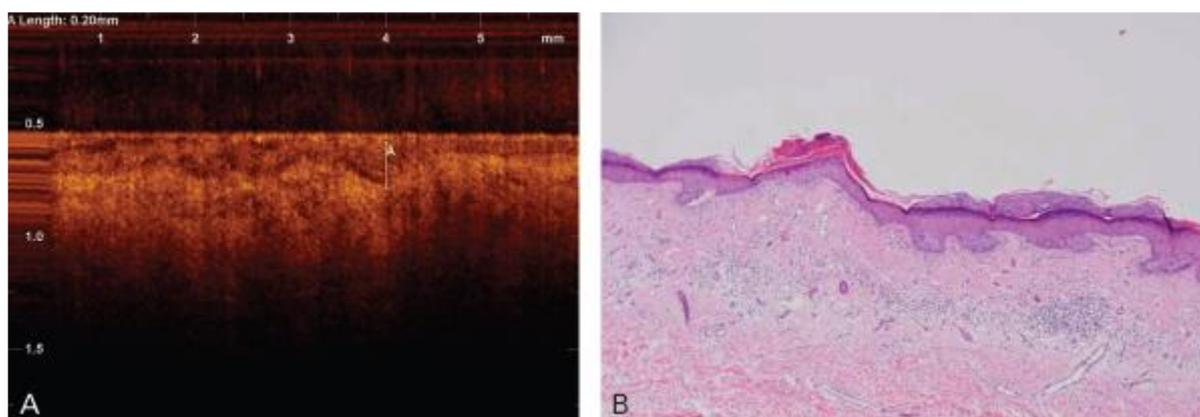
Одним из широко используемых методов визуализации кожи с начала 1990-х годов является оптическая когерентная томография (ОКТ) [122]. Это интерферометрический метод, при котором изображение структуры ткани получают путем регистрации низкокогерентного света, обратно рассеянного или отраженного тканью [30], [123]. Первоначальной версией ОКТ была ОКТ во временной области (Time-domain OCT, TD-OCT), главной особенностью которой было быстрое перемещение опорного зеркала внутреннего интерферометра, позволяющее проводить продольное сканирование кожи [30]. На основе этого метода была разработана полнопольная ОКТ (Full-field OCT, FF-OCT), характеризующаяся возможностью получать изображения кожи «в анфас» без необходимости сканирования вдоль образца [124]. Другой метод — ОКТ в частотной (или Фурье) области (Frequency-domain OCT, FD-OCT). Его особенностью является отсутствие сканирования эталонного зеркала; вместо этого сканирование осуществляется по длинам волн источника [125]. Наконец, недавно изобретенный метод — это конфокальная ОКТ с линейным полем (Line-field Confocal OCT, LC-OCT). Он сочетает в себе преимущества ОКТ во временной области и конфокальной микроскопии и обеспечивает 3D-визуализацию тканей с высоким разрешением, что позволяет различать клеточную структуру кожи [126].

Сравнительно (по сравнению с другими оптическими методами диагностики кожи) большая глубина проникновения (0.5-2 мм в зависимости от методики ОКТ) является основным преимуществом этого метода, что сделало его одним из наиболее часто используемых методов неинвазивной диагностики морфологических свойств кожи в реальном времени [30].

Диагностике актинического кератоза кожи посвящено много работ [127]–[130]. Дисплазия и нарушение целостности эпидермиса отчётливо обнаруживалась на полученных ОКТ-изображениях в виде белых пятен. Значения чувствительности и специфичности выше ~80%

были получены в исследовании по дифференциации участков кожи на здоровые и пораженные актиническим кератозом [128], [129]. В работе [129] показано, что хотя визуальная дифференциация пораженного участка на актинический кератоз и рак кожи невозможна с помощью методики ОКТ, применение алгоритмов машинного обучения к полученным изображениям позволило провести эту дифференциацию с точностью до более чем 73%.

Большинство применений ОКТ в анализе рака кожи за последнее десятилетие было посвящено базально-клеточному раку [129]–[133]. При анализе зон локализации БКК слою кожи, отлично отображаемые на ОКТ-снимках здоровых образцов, были заметно искажены появлением черных круглых артефактов, а также появилась возможность наблюдать изменения геометрии эпидермиса кожи [129], [130]. Несмотря на трудности определения стадии развития БКК с помощью ОКТ, этот метод оптической диагностики кожи показал высокую точность определения глуболежащих границ опухоли, по сравнению с эффективностью инвазивных гистопатологических методов определения границ поражения (Рисунок 10) [131]–[133]. Основным недостатком метода ОКТ можно считать отсутствие биохимической информации об исследуемых участках кожи. Однако большая глубина зондирования в сочетании с высокой разрешающей способностью, скоростью и неинвазивностью делает ОКТ эффективным методом определения границ пораженных участков кожи для дальнейшего оперативного лечения.



**Рисунок 10.** (А) ОКТ-изображение поверхностной БКК, показывающее зачатки опухоли, прикрепленные к эпидермису. Заметно сниженная отражательная способность (потемнение) на периферии опухоли и повышенная отражательная способность (светлые участки) окружающей стромы. (В) Гистопатологический образец того же поражения, показывающий опухолевые зачатки, прикрепленные к эпидермису (гематоксилин-эозин; увеличение  $\times 40$ ) [132].

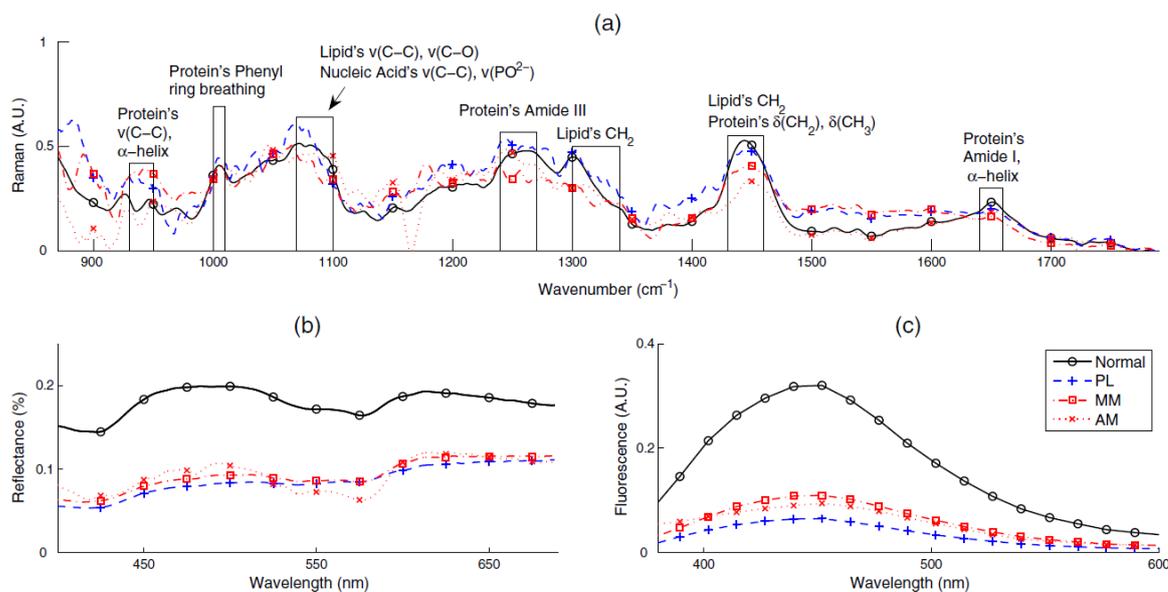
### 1.2.3. Комбинированные методы

В последнее десятилетие наряду с отдельным применением оптических методов для диагностики кожных заболеваний предлагались и апробировались различные комбинации оптических методов [7]. Из-за огромного разнообразия видов злокачественных новообразований кожи, а также диспластических доброкачественных изменений весь диапазон спектральных характеристик, в которых содержатся так называемые маркеры метаболических

процессов, недоступен для анализа единым оптическим методом. Например, флуоресцентная спектроскопия кожи хорошо зарекомендовала себя в диагностике немеланомного рака кожи и связанных с ним предраковых поражений, но плохо применима в диагностике пигментных доброкачественных поражений и дифференциации на здоровую кожу и меланому из-за слабого флуоресцентного сигнала, создаваемого пигментированными участками кожи. Таким образом, сочетание нескольких оптических методов позволяет расширить диагностические возможности оптической диагностики.

Одним из наиболее часто используемых комбинированных методов в научной литературе в последние годы является сочетание флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения для диагностики патологических изменений кожи. Например, в работах [21], [23] показано, что бимодальный анализ методом флуоресцентной спектроскопии на нескольких длинах волн возбуждения и спектроскопии диффузного отражения приводит к повышению точности диагностики по сравнению с методом одиночной флуоресцентной спектроскопии при различении трех типов гиперплазии кожи. Thompson *и др.* [93] сообщили о 87% правильно диагностированных случаев БКК с использованием этого мультимодального метода. По результатам исследования Rajaram *и др.* [90], чувствительность и специфичность диагностики БКК этим методом составляет до 94 и 89% соответственно, тогда как чувствительность выявления актинического кератоза и плоскоклеточного рака составляет 100%, хотя специфичность для этих специфических новообразований снижена (50%). Дифференциацию на здоровую кожу и такие виды кожных образований, как гемангиомы, фибромы и ангиокератомы, а также их дифференциацию между собой проводили с помощью лазерной флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения со значениями чувствительности и специфичности выше 90% [134]. Vorisova *и др.* представили в своей работе [87] результаты дифференциации диспластических невусов и меланомы кожи. Полученные значения чувствительности и специфичности составили 92% и 78% соответственно.

В исследовании [20] представлены результаты одновременного анализа злокачественных поражений кожи с помощью флуоресцентной спектроскопии, спектроскопии диффузного отражения и спектроскопии комбинационного рассеяния (Рисунок 11). Результаты классификации сравнивали с результатами стандартных гистопатологических исследований. При дифференциации меланомы от доброкачественных пигментных образований получены значения чувствительности и специфичности 100%. Эти же значения при дифференциации исследованных участков кожи на карциному и актинический кератоз составили 95 и 71% соответственно. Дифференциация здоровой кожи от группы заболеваний (актинический кератоз, БКК, плоскоклеточный рак) показала чувствительность 90% и специфичность 85%.



**Рисунок 11.** Спектры меланомы (ММ), немеланомных пигментных поражений (PL) и нормальной кожи. Одним из очагов меланомы является амеланотическая меланома (АМ): (а) спектроскопия комбинационного рассеяния, (б) спектроскопия диффузного отражения и (с) флуоресцентная спектроскопия [20].

ОКТ, наряду со всеми описанными выше достоинствами, имеет и основной недостаток, выражающийся в возможности только визуализировать структуру ткани без предоставления специалисту информации о биохимическом составе обследуемой кожи. Carstea и соавторы продемонстрировали потенциал комбинированного использования ОКТ и флуоресцентной спектроскопии, что позволило получить помимо структурной информации еще и дополнительную биохимическую информацию об анализируемой коже [135].

Таким образом, совокупная информация, полученная с помощью комбинации оптических методов, позволяет проводить неинвазивный анализ структурных и биохимических изменений кожи с высоким разрешением, что дает возможность использовать эти методы для клинической диагностики поражений кожи и определения границы опухолей для оперативного лечения *in vivo* в режиме реального времени. Однако сильное рассеяние света кожей остается серьезной проблемой, которая ограничивает глубину зондирования вышеупомянутыми оптическими методами.

### 1.3. Оптическое просветление кожи

Как описано в разделе 1.2. настоящей главы, основным фактором, ограничивающим возможности оптических методов в диагностике кожи, существенно снижающим их контрастность и глубину зондирования, является сильное рассеяние света кожей. Основной причиной сильного рассеяния кожи, как обсуждалось ранее, является рассогласование показателей преломления между структурными элементами (рассеивателями), такими как клеточные мембраны, ядра и органеллы, белковые волокна, липидные капли и внутритканевой жидкостью, в основном состоящей из воды. Более того, клеточная цитоплазма также в

основном состоит из воды, принося оптическую неоднородность уже на внутриклеточном уровне [30], [35], [43]. Степень рассогласования  $m$ , рассчитываемая как отношение показателя преломления кожных рассеивателей  $n_{scatter}$  к показателю преломления тканевой жидкости  $n_{ISF}$ , позволяет оценить степень рассеяния кожи. Так, при длине волны 589.6 нм значение  $n_{ISF}$  изменяется от 1.35 до 1.37 [136], тогда как для коллагена, составляющего основную массу соединительной ткани, показатель преломления зависит от степени его гидратации и был измерен как 1.474 [137]. Показатель преломления меланина кожи составляет 1.6 [136], что даже выше, чем у коллагена. На примере этих двух рассеивателей уже становится заметно, что значение  $m$  для кожи превышает единицу. Поскольку неоднородная структура кожи содержит огромное количество таких локальных границ раздела рассеиватель/внутриклеточная жидкость, вероятность рассеяния из-за рассогласованности показателей преломления на границе раздела очень велика для фотонов оптического излучения, распространяющихся в коже. Снижение кожного рассеяния возможно, если значение  $m$  становится равно или близко к 1. Технология иммерсионного оптического просветления (ОП) биологических тканей [35], заключается в управляемом повышении показателя преломления внутриклеточной жидкости  $n_{ISF}$ . Этот метод позволяет эффективно согласовывать ПП в коже, что приводит к уменьшению коэффициента рассеяния кожи ( $\mu_s(\lambda)=0$ ), а также к увеличению направленности одиночных актов рассеяния ( $g=1$ ).

### 1.3.1. Принцип действия

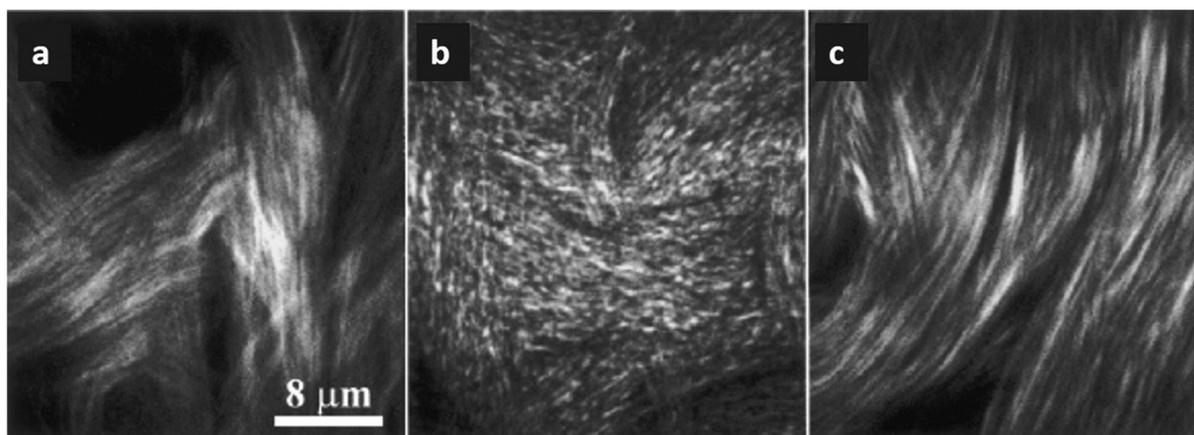
Этот метод в основном основан на использовании гиперосмотических химических агентов, называемых оптическими просветляющими агентами (ОПА). При погружении образцов кожи *ex vivo* в такое вещество или при поверхностном нанесении (применимо к коже *in vivo*) оно оказывает осмотическое давление на кожу, изменяя естественный градиент концентрации воды в роговом слое кожи. Благодаря этому осмотическому давлению свободные молекулы воды, находящиеся в межклеточном пространстве, вынуждены выходить наружу. Таким образом, организуется выделение воды из кожи во внешнюю среду. За счет выделения воды из образца кожи ее толщина уменьшается, и повышается компактность организации рассеивателей кожи [30], [35], [136], [138], [139]. Ожидаемый рост концентрации рассеивателей на единицу объема в этом случае должен привести к увеличению рассеяния кожи, однако из-за уменьшения её толщины в сочетании с более регулярной укладкой рассеивателей пропускание света через кожу увеличивается [136], [139]. Это связано с тем, что с потерей воды объемная доля кожных рассеивателей  $f_s$  увеличивается, так как абсолютный объем рассеивателей  $V_s$  остается постоянным, но при этом изменяется объем образца  $V$  (так называемое сжатие кожи).

Описанный механизм дегидратации является одним из трех основных механизмов оптического просветления кожи [31], [136], [140]–[144]. Подобные изменения внутренней конфигурации кожных рассеивателей характерны и для механического сжатия и растяжения кожи [145], [146]. Осмотическое давление также является основным механизмом, ответственным за токсичность ОПА, так как сильное осмотическое давление может привести к необратимому разрушению структуры ткани [147].

Второй механизм оптического просветления кожи – согласование показателей преломления структурных компонентов кожи и внутритканевой жидкости. Он происходит параллельно с процессом дегидратации кожи, так как в процессе оттока воды из кожи во внешнюю среду молекулы гиперосмотического агента также начинают диффундировать в кожу [30], [32]–[34], [140]–[142], [148]–[151]. Поскольку ПП используемых ОПА выше, чем у воды, это приводит к уменьшению значения  $m$ , вызывая тем самым согласование ПП рассеивателей и внутритканевой жидкости [138], [139], [146], [152]–[154]. Ключевой особенностью этих механизмов является их обратимость, так как содержание воды в коже может восстанавливаться либо путем ее погружения в физиологический раствор (*ex vivo*), либо путем вымывания ОПА соседними, хорошо гидратированными участками кожи *in vivo*. Для фиброзных тканей, таких как кожная дерма, второй механизм доминирует над первым, так как выраженная дегидратация возможна только при применении гиперосмотических агентов, при этом размер молекул ОПА значительно меньше среднего значения межфибрилярного пространства [34], [148], [155], [156].

В то же время показано, что некоторые гигроскопичные вещества, например глицерин, могут вызывать отек или эдему кожи за счет связывания молекул воды в межклеточном пространстве. Эти молекулы воды снижают исходный ПП ОПА, препятствуя достижению высокого уровня согласования ПП в коже. В результате происходит увеличение коэффициента рассеяния кожи  $\mu_s(\lambda)$  и уменьшение сигнала коллимированного пропускания через кожу [35].

Третий механизм оптического просветления кожи напрямую связан с молекулярными особенностями некоторых гиперосмотических агентов и их способностью взаимодействовать с молекулярной структурой кожных рассеивателей [30], [35]. Одним из основных рассеивателей в коже является коллаген, который организован в сложные волокнистые структуры. Водородные связи являются основной связующей силой в тройных спиральных коллагенах. Использование ОПА с большим количеством гидроксильных групп позволяет экранировать водородные связи в спиральных коллагенах. Эта нековалентная дестабилизация водородных связей приводит к временной диссоциации коллагеновых волокон (Рисунок 11) [157]. Уменьшая таким образом размеры основных рассеивающих компонентов кожи, достигается уменьшение рассеяния кожи.



**Рисунок 12.** Обратимый эффект глицерина на дерму грызунов. ГВГ-изображения (а) до нанесения глицерина, (b) после нанесения глицерина, (с) после регидратации фосфатно-солевым буфером (PBS) [157].

Однако в работе [143] было показано, что действие глицерина при оптическом просветлении образцов кожи *in vivo* не вызывало диссоциации коллагеновых волокон. Удалось наблюдать лишь уменьшение диаметра коллагеновых волокон, что также отразилось на уменьшении рассеяния кожи и вместе со снижением толщины образца стало основным механизмом оптического просветления *in vivo*.

Таким образом, тройное сочетание эффекта дегидратации, обусловленного высокой осмолярностью используемых ОПА, согласования ПП рассеивателей кожи и внутритканевой жидкости за счет проникновения ОПА в межклеточное пространство, а также обратимой диссоциации структурных протеинов кожи являются основными механизмами оптического просветления кожи.

### 1.3.2. Оптические просветляющие агенты (ОПА)

Эффективность оптического просветления зависит от ПП используемых агентов, их осмолярности и физико-химических свойств, и в то же время зависит от физиологических характеристик, таких как pH и температура [43] биологических тканей, что напрямую влияет на скорость диффузии ОПА [30].

В настоящее время ОПА, используемые для просветления, можно условно разделить на 5 основных групп (Таблица 2): Сахара (глюкоза, фруктоза, сахароза, декстроза, рибоза) [141], [156], [158]–[166]; Многоатомные спирты (пропиленгликоль (ПГ), глицерин, полиэтиленгликоли различной молекулярной массы (ПЭГ), маннит, ксилит, сорбит) [143], [152], [155], [162], [163], [167]–[177]; Жирные кислоты, такие как линолевая и олеиновая [37], [178]; Органические растворители (диметилсульфоксид (ДМСО) и тиазон) [37], [40], [142], [178]–[187]; Электролитные контрастные агенты (Тразограф™, Верографин™, Гипак™ и Омнипак™) [32]–[34]. Типичной формой выпуска последних является 60% и 76% раствор смеси диатризоата натрия (635.89 г/моль) и/или диатризоата меглюмина (809.13 г/моль).

**Таблица 2.** Основные химические вещества, используемые в качестве ОПА. Данные взяты из собственных измерений и работ [30], [35], [43].

Группа	ОПА	Молекулярная масса (г/моль)	ПП ( $\lambda=589$ нм)
Сахара	Глюкоза	180.2	1.4148 (54%-раствор)
	Фруктоза	180.2	1.4141 (48%-раствор)
	Сахароза	342.3	1.4906 (80%-раствор)
Многоатомные спирты	Пропиленгликоль (ПГ)	76.1	1.4326
	Глицерин	92.1	1.4747
	Полиэтиленгликоль – 400 (ПЭГ-400)	380-420	1.4558
	Сорбит	182.2	1.375
Жирные кислоты	Линолевая кислота	280.4	1.4699
	Олеиновая кислота	282.46	1.4583
Органические растворители	Диметилсульфоксид (ДМСО)	78.13	1.4731
	Тиазон	162.3	1.5383
Электролитные контрастные агенты	Тразограф <sup>TM</sup> -76	635.89/809.13	1.460
	Верографин <sup>TM</sup> -76	635.89/809.13	1.485
	Гипак <sup>TM</sup>	635.89/809.13	1.437

На основании имеющихся научных публикаций [32]–[35], [43], [136], [140], [151], [179], [183], [188]–[190], можно сделать вывод, что глицерин, глюкоза, ПГ и ПЭГ являются наиболее часто используемыми ОПА для просветления биологических тканей. Более того, в работах [173], [174] было показано, что эффективность оптического просветления не зависит напрямую от ПП используемого ОПА, а зависит от особенностей молекулярной структуры, определяющей взаимодействие ОПА со структурными компонентами кожи.

ОПА из группы спиртов являются типичными многоатомными спиртами и имеют сходные особенности молекулярного строения в виде наличия более одной гидроксильной группы. Их гидрофильные свойства в сочетании с гиперосмотическими свойствами вызывают дегидратацию и сжатие кожи, что приводит к снижению рассеяния [30], [32]–[35]. Более того, работа [174] показала, что эффективность ОП напрямую зависит от количества гидроксильных групп в используемых ОПА, что объясняется их способностью нарушать высокоуровневую структуру белков кожи, таких как коллаген. А в работе [159] было установлено, что спирты, гидроксильные группы которых расположены достаточно далеко друг от друга в углеродной цепи, обладают большим потенциалом для ОП, чем те спирты, гидроксильные группы которых располагались рядом друг с другом.

ОПА из группы сахаров представлены моносахаридами, отличительной особенностью которых также является гидрофильность и наличие более одной гидроксильной группы. Благодаря этому они способны образовывать водородные связи и мостики, влияющие на

организацию структурного белка кожи [30], [35], [191]. В работе [166] показано, что растворы глюкозы, фруктозы и рибозы обладают потенциалом оптического просветления близким к потенциалу многоатомных спиртов; однако основной проблемой для их проникновения в кожу является естественный барьер рогового слоя, методы повышения проницаемости которого будут рассмотрены в следующем подразделе.

Ненасыщенные жирные кислоты благодаря своим липофильным свойствам могут взаимодействовать с липидными доменами рогового слоя и изменять их проницаемость, поэтому изначально эти кислоты, считавшиеся полностью биосовместимыми [192], использовались для доставки лекарств в кожу [193], [194]. Однако в последующем их стали использовать в оптическом просветлении кожи в качестве биосовместимых ОПА, способных согласовывать ПП и снижать рассеяние кожи за счет замены внутритканевой жидкости [30], [32]–[35].

Общий принцип действия ОПА, относящихся к категории органических растворителей, заключается во взаимодействии с белками и липидными доменами рогового слоя [46]. ДМСО, например, может изменять межклеточную конформацию кератина, а также взаимодействовать с полярными головками липидного бислоя кожи, нарушая его геометрию и уменьшая рассеивание кожи [43]. При исследовании рогового слоя кожи с использованием ДМСО [142] было показано, что он, подобно спиртам и сахарам, способен взаимодействовать со структурными белками кожной дермы, что приводило к уменьшению рассеяния и увеличению сигнала коллимированного пропускания. Причем этот сигнал напрямую зависел от концентрации ДМСО в коже.

Электролитные контрастные агенты классифицируются как отдельная категория ОПА из-за их химических свойств. Изначально гидрофильные бесцветные жидкости, они также обладают ПП значительно большим, чем у внутритканевой жидкости, что позволяет использовать их для ОП кожи. Йогексол, также известный как Омнипак™, может использоваться в исследованиях *in vivo*, так как имеет низкую осмолярность по сравнению с другими обычно используемыми ОПА, что позволяет избежать потенциальных цитотоксических эффектов и структурных деформаций. Низкая вязкость обеспечивает быстрое проникновение агентов этого типа вглубь кожи [32], [35], [43].

Для экспериментов, связанных с оптическим просветлением кожи, желательно использовать такие комбинации ОПА, спектральные характеристики которых не имеют явных полос поглощения и обладают высоким пропусканием в исследуемом спектральном диапазоне. В настоящее время исследуются различные сочетания ОПА из различных групп с целью поиска наиболее эффективных комбинаций [35], [43].

При планировании *in vivo* экспериментов по оптическому просветлению кожи необходимо учитывать потенциальную токсичность ОПА. Практически все перечисленные ОПА, относящиеся к основным 5 группам, позиционируются в научной литературе как нетоксичные. Однако высокие концентрации агентов, обычно используемые в экспериментах *ex vivo*, и длительное время нанесения ОПА могут вызывать нежелательные эффекты в условиях *in vivo*, такие как гемостаз [162], сжатие и даже некроз кожи [195]. В многочисленных исследованиях также сообщалось о местных побочных эффектах применения ОПА, таких как раздражение и эдема [143], [155], [156], [160], [161]. Хотя большинство этих эффектов обратимы и исчезают вскоре после окончания воздействия ОПА, клиническое использование этих веществ *in vivo* часто может быть связано с поражёнными участками кожи. В связи с этим обычно высокие концентрации ОПА, упоминаемые в научной литературе, должны быть снижены при переходе к клиническим исследованиям, чтобы соответствовать клиническим требованиям применимости и биосовместимости [35].

Также стоит отметить, что для целей исследования биологических тканей *in vitro* в биологии и молекулярном анализе используются более сложные композиции ОПА в сочетании со специализированными протоколами, такими как линейка 3DISCO (3D imaging of solvent-cleared organs), линейка CUBIC, SeeDB (see deep brain), ScaleS, Clear T2, CLARITY, PACT (passive CLARITY technique) и многие другие. Эти методы предполагают полное просветление с помощью химических веществ в течение длительного времени (от часов до нескольких дней/недель или даже месяцев) различных органов, включая человеческие [35]. Однако эти технологии непригодны для биосовместимого оптического просветления кожи *in vivo* из-за необратимых химических изменений в обрабатываемых образцах, таких как, например, делипидизация, декальцинация и гибридизация с гидрогелем [35].

### 1.3.3. Усилители проницаемости

При оптическом просветлении кожи основным способом достижения неинвазивного биосовместимого эффекта ОПА является их нанесение на поверхность кожи. Однако барьерные свойства рогового слоя ограничивают проникновение химических веществ (в том числе ОПА, которые в основном являются гидрофильными химическими агентами) в кожу. В настоящее время активно используются методы усиления диффузии ОПА в кожу для ускорения согласования показателей преломления, а также для достижения аналогичного эффекта при использовании сниженных концентраций ОПА, что полезно при переносе методики оптического просветления в клинические условия.

Одним из способов повышения проницаемости кожи для ОПА является использование так называемых химических усилителей проницаемости [32]–[35], [43], [46]. В сочетании с ОПА

они позволяют ускорить диффузию данных ОПА через роговой слой в более глубокие слои. Этанол, ПГ, ДМСО, азон, тиазон, олеиновая кислота и гиалуроновая кислота [34], [36], [38], [40], [142], [166], [180]–[182], [184], [186], [187], [190], [196]–[205] в последнее время являются основными химическими усилителями проницаемости эпидермиса.

Этанол — гидрофильный растворитель, широко используемый в различных химических трансдермальных препаратах. Его принцип действия заключается в изменении барьерных свойств рогового слоя и усилении чрескожной диффузии ОПА, главным образом за счет растворения липидов рогового слоя [199], [200].

ДМСО, помимо того, что он сам используется в качестве ОПА, способен повышать проницаемость рогового слоя для гидрофильных ОПА за счет изменения структурной целостности липидного бислоя [202]. Совместное использование этанола и ДМСО в качестве химических усилителей проницаемости позволяет добиться гораздо большего эффекта, чем при использовании этих веществ по отдельности и в высоких концентрациях [206].

ПГ используется в качестве усилителя проницаемости, так как он способен растворять кератин рогового слоя кожи и интегрироваться в структуру липидного бислоя, усиливая диффузию гидрофильных ОПА [46], [207]. Кроме того, в работе [36] была продемонстрирована эффективность ПГ именно как энхансера (усилителя проницаемости, от англ. *enhance* – усиливать), так как его собственный потенциал оптического просветления был ниже, чем у других используемых ОПА.

Азон и его производные, такие как тиазон, использовались в некоторых исследованиях в качестве усилителей проницаемости кожи для ОПА [33], [36]. Принцип их действия, по-видимому, заключается в формировании отдельной фазы внутри липидного бислоя в роговом слое кожи [46]. Однако эти вещества еще не были одобрены FDA для применения на коже, вероятно, из-за их использования в качестве инсектицидов, гербицидов, а также из-за обнаруженной противовирусной активности (что не позволяет отнести их к неактивным химическим ингредиентам).

Олеиновая кислота, как и другие жирные кислоты, способна нарушать естественную организацию рогового слоя за счет интеграции в нее своей длинной изогнутой молекулярной структуры, увеличивая проницаемость кожи для гидрофильных ОПА [39], [46], [178].

Гиалуроновая кислота (ГК) с недавнего времени используется для усиления диффузии ОПА через кожу благодаря ее естественной биосовместимости, биоразлагаемости и неиммуногенности. Это линейный полисахарид, естественным образом вырабатываемый человеческим организмом. Было предложено несколько теорий для объяснения эффекта усиления проницаемости [208]–[210]. Одной из них является гидрофильное взаимодействие ГК - увлажнение и разрыхление рогового слоя за счет взаимодействия большого количества

молекул воды в коже с полимерной основой гиалуроновой кислоты. Также была предложена другая теория, согласно которой липофильные домены ГК могут изменять структуру кератина путем взаимодействия с ним и, таким образом, приводить к появлению неупорядоченных областей липидных бислоев [210], увеличивая скорость диффузии ОПА через роговой слой.

В отличие от химических методов повышения эпидермальной проницаемости, различные физические методы усиления трансдермальной диффузии ОПА, применяемые в экспериментальных подходах, имеют некоторые преимущества в виде отсутствия взаимодействия ОПА с химическими усилителями проницаемости, а также сниженного риска дополнительного раздражения кожи за счет отсутствия дополнительного химического воздействия [34]. Среди этих методов можно выделить частичное удаление рогового слоя [211]–[214], облучение поверхности кожи лазерным излучением различной интенсивности [215], [216], механическую и фототермическую микроперфорацию кожи [217], [218], лазерную абляцию [219], [220], фракционную микроабляцию [221], ионофорез [222], сонофорез [223], [224] и использование микроигл [225], [226].

Удаление рогового слоя частично нарушает целостность основного кожного барьера, препятствующего диффундированию ОПА в кожу, и может быть выполнено различными методами, включая использование липкой ленты [211], применение медицинского клея [212], протирание абразивной (наждачной) бумагой [213] или микродермабразию [214]. Например, в работе [223] показано увеличение до 15% амплитуды полученного с глубоких слоёв кожи ОКТ-сигнала после удаления рогового слоя.

Нагрев рогового слоя в сочетании с фотомеханическим эффектом, приводящий к нарушению его барьерной функции, позволяет использовать лазерное излучение в качестве усилителя (энхансера) диффузии ОПА через кожу. В работе [216] показано, что чрескожная диффузия ОПА при использовании лазерного излучения увеличилась в несколько раз по сравнению с диффузией в интактную кожу.

Нарушение целостности рогового слоя, достигаемое при микроперфорации, позволяет создавать в структуре поверхностного слоя кожи микроскопические каналы, через которые ОПА могут напрямую проникать в более глубокие слои кожи. Такие каналы можно получить как оптически, с помощью излучения лампы [217], так и механически, например, с помощью микроигльчатого валика [218].

Микроабляция с использованием источников лазерного излучения позволяет добиться эффекта, аналогичного микроперфорации. Более того, лазерное излучение позволяет регулировать глубину и форму каналов, создаваемых в коже [221]. Однако оптомеханическое повреждение эпидермиса, вызванное лазерным излучением, может привести к различным

негативным эффектам, таким как отек [220], [221], и затруднить процесс согласования ПП под воздействием ОПА.

При ионофорезе электрический ток, подаваемый на поверхность кожи, индуцирует диффузный трансдермальный поток ионов, позволяющий доставлять заряженные или гидрофильные молекулы, как например молекулы ОПА, глубоко в кожу. Ионофорез напрямую не изменяет проницаемость рогового слоя: молекулы, увлекаемые диффузным потоком ионов или электроосмотическим потоком воды (в присутствии электролитов), выбирают путь наименьшего сопротивления (например, волосяные фолликулы), при этом проникая вглубь кожи [46]. В работе [222] было показано, что объемный поток ОПА через кожу при использовании ионофореза увеличился примерно в 20 раз по сравнению с пассивной диффузией.

Воздействие на кожу ультразвука (УЗ) частотой 1-1.5 МГц (сонофорез) вызывает эффект кавитации, заключающийся в образовании, осцилляции и последующем схлопывании микропузырьков внутри слоев кожи. Осцилляция пузырьков оказывает на кожу напряжение сдвига, а в результате их схлопывания локальные ударные волны вызывают нарушение целостности рогового слоя, повышая проницаемость кожи для ОПА [35], [46], [227]–[229]. Кроме того, кавитация вызывает изменение в упорядоченной структуре коллагеновых волокон, снижая рассеяние кожи [223], [227]. В исследовании [230] продемонстрировано увеличение эффективности оптического просветления 60% растворами глицерина и ПЭГ-400 при воздействии ультразвука в 1.5 и 1.6 раза соответственно по сравнению с их воздействием без применения ультразвука.

Кроме того, значительные результаты были получены при оптическом просветлении, усиленном комбинацией химических и физических усилителей проницаемости [38], [186], [231], [232] или комбинацией нескольких физических усилителей проницаемости [212], [221], [223], [233]–[235].

#### *1.3.4. Применение оптического просветления в оптических методах диагностики кожи*

В последнее время в большом количестве научных публикаций демонстрировались возможности использования методики оптического просветления для уменьшения рассеяния кожи, что позволяет повысить контрастность и глубину зондирования различных оптических методов диагностики кожи [32]–[35], [43], в частности, рассматриваемых в данной работе.

Влияние просветления кожи человека *in vivo* на глубину визуализации методом ОКТ, а также на артефакты, вызванные рассеянием кожи, было исследовано в [236]. Оба

использованных ОПА (глицерин и ультразвуковой гель) позволили снизить интенсивность артефактов на ОКТ-изображениях и увеличить глубину зондирования в 1.5 раза.

Поверхностное нанесение раствора ПГ на кожу человека *in vivo* позволило наблюдать увеличение контрастности и глубины зондирования изображений, полученных методом ОКТ [237].

Оптическое просветление меланомы кожи *in vivo* смесью ПЭГ-400 и бутандиола методами было исследовано методами ОКТ и спектроскопии диффузного отражения в работе [238]. В результате было показано, что сигнал диффузного отражения кожи уменьшился на 90% через 45 минут просветления, а глубина зондирования методом ОКТ увеличилась в 2.5 раза, что позволило визуализировать микроциркуляторное русло меланомы на глубине 750 мкм.

В работе [239], Не и др. исследовали влияние оптического просветления кожи *in vivo* различными ОПА на эффективность мониторинга уровня глюкозы в крови с помощью ОКТ. Наилучшие результаты показало поверхностное нанесение 50% раствора глицерина, при котором коэффициент корреляции между наклоном кривой ОКТ-сигнала и концентрацией глюкозы в крови улучшился в среднем на 7.1%. Раствор маннита показал аналогичные, но менее выраженные результаты.

В недавней работе [240], салициловая кислота была использована в качестве ОПА в сочетании с химическим усилителем проницаемости эпидермиса (азоном) для исследования методами ОКТ и спектроскопии диффузного отражения их синергетического эффекта на кожу *in vivo*. Увеличение концентрации салициловой кислоты привело к более сильному снижению сигнала отражения кожи. Кроме того, наилучший синергетический эффект на глубину зондирования ОКТ (увеличение ~32%) был получен при использовании 1% салициловой кислоты и 1% азона.

Те же оптические методы диагностики кожи использовались в исследовании [186], где комбинированное оптическое просветление кожи человека *in vivo* смесью тиазона и ПЭГ-400, усиленное ультразвуком, привело к увеличению глубины проникновения света в кожу на 41%. Сигнал диффузного отражения уменьшился на 15.5% уже после 10 минут просветления.

В работе [223] к темной коже (фототип IV) *in vivo* был применён комбинированный протокол оптического просветления, состоящий из нанесения липофильного ОПА (олеиновой кислоты) в сочетании с микродермабразией и сонофорезом. На глубине 400 мкм амплитуда ОКТ-сигнала увеличилась на 34% в результате просветления, что говорит об улучшенном потенциале клинического анализа высокопигментированной кожи.

В многочисленных работах, в том числе и недавних, по спектральным исследованиям эффекта оптического просветления кожи лабораторных животных приводятся аналогичные результаты, заключающиеся в снижении общего уровня сигнала диффузного отражения кожи

[162], [175], [241]–[243] и увеличении сигнала флуоресценции, зарегистрированного от глубоко расположенных флуорофоров [244], [245].

В работе [246], Рена и др. продемонстрировал с использованием метода ОКТ, что поверхностное нанесение ОПА снижает электрокинетический ответ тканей, что обеспечивает новое применение в анализе биоэлектрического импеданса, позволяя оценивать электрические свойства биологических тканей.

## **Выводы**

Анализ литературы продемонстрировал, что, во-первых, из-за огромного разнообразия видов злокачественных новообразований кожи, а также диспластических доброкачественных изменений весь диапазон спектральных «маркеров» недоступен для анализа единым оптическим методом. Сочетание нескольких оптических методов позволяет расширить диагностические возможности оптической диагностики. Однако сильное рассеяние света кожей ограничивает глубину зондирования оптическими методами, значительно снижая их эффективность.

Во-вторых, было показано, что рассеивающими и поглощающими свойствами кожи, являющимися основной причиной ограничения использования оптических методов в диагностике кожи, можно управлять с помощью оптического просветления кожи. Однако данная методика недостаточно адаптирована для внедрения в реальные клинические практики диагностики и терапии патологических образований кожи. ОПА, результаты применения которых были упомянуты, в основном не отвечают клиническим требованиям биосовместимости, что не позволяет перенести эту методику в данном виде для использования на патологически изменённых участках кожи пациентов *in vivo*.

Потенциальным способом преодоления указанных ограничений является использование мультимодального подхода, предполагающего использование методов оптической спектроскопии и визуализации *in vivo* (или их комбинированное использование) с пространственным разрешением, методики оптического просветления кожи оптическими агентами в биосовместимых концентрациях и методов усиления проницаемости кожи, позволяющих компенсировать эффект сниженной концентрации ОПА.

## ГЛАВА 2. Экспериментальное исследование эффекта оптического просветления в сочетании с бимодальным методом оптической диагностики

### 2.1. Введение

Как было описано в предыдущей главе, оптические методы диагностики кожи являются эффективной альтернативой традиционным инвазивным методам диагностики. Они позволяют получать информацию о структурном и биохимическом строении тканей кожи *in vivo* в реальном времени, что обусловило их широкое внедрение в клиническую практику анализа новообразований кожи. В приведенном выше обзоре научной литературы было продемонстрировано, что рассеивающими свойствами кожи, являющимися основной причиной ограничения использования оптических методов в диагностике кожи, можно управлять с помощью методики оптического просветления кожи.

Однако, несмотря на многочисленные исследования, упомянутые в обзоре литературы, мультимодальный подход (описанный в предыдущих разделах) ранее не был реализован. Кроме того, влияние механического давления зонда на оптические параметры кожи при таких измерениях не учитывалось или изучалось отдельно.

Таким образом, цель нашего экспериментального исследования, представленного в этой главе, была двойной: исследовать влияние процесса оптического просветления образцов кожи человека *ex vivo* на спектры диффузного отражения и автофлуоресценции с пространственным разрешением, используя две комбинации ОПА и химических усилителей проницаемости, а также количественно оценить эффект просветления, вызванный дегидратацией и давлением спектрального зонда на кожу. Эти два взаимодополняющих экспериментальных исследования были выполнены в лаборатории CRAN (Университет Лотарингии, Франция) в сотрудничестве с региональной больницей Мец-Тионвиль (исследование на образцах кожи человека) и в Саратовском государственном университете (Саратов, Россия) (исследование на образцах кожи крыс).

### 2.2. Методы и материалы

#### 2.2.1. Химические вещества, использованные для оптического просветления

В этом исследовании, две различных смеси ОПА и химических усилителей проницаемости были выбраны для использования на основе имеющихся литературных данных [187] и собственных предварительных исследований [247], [248] по причине их хорошего потенциала оптического просветления. Первая смесь ОПА (ОПА 1) состояла из Полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400, Sigma-Aldrich, США), Пропиленгликоля (ПГ, Sigma-Aldrich, США) и водного 3М-

раствора сахарозы (Sigma-Aldrich, США): объёмные доли составили 45%, 5% и 50%, соответственно. Вторая смесь ОПА (ОПА 2) состояла из ПЭГ-400 и Диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma-Aldrich, США): объёмные доли составили 80% и 20%, соответственно. Показатели преломления, измеренные на рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония) на длине волны 480 нм при комнатной температуре (24 °С), составили 1.448 для ОПА 1 и 1.466 для ОПА 2.

### 2.2.2. Подготовка образцов кожи

Для протокола измерений, выполненного на *ex vivo* образцах человеческой кожи, 13 полосок кожи были получены с послеоперационных отходов с помощью устройства Acculan 3Ti Dermatome (Aescular®, Chaumont, Франция) во время хирургической операции после получения согласия пациента. Затем толщина кожи была измерена на гистологических предметных стеклах с помощью стандартного оптического микроскопа. Она была определена для каждого образца как среднее значение по 10 измерениям, выполненным на равноудалённых участках окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезов (с использованием программного обеспечения в открытом доступе Piximetre). Среднее значение по 13 образцам кожи составило  $900 \pm 280$  мкм. Разрешение на использование послеоперационных отходов для данного исследования было выдано Этическим комитетом INSERM (Национальный институт здоровья и медицинских исследований, Франция), IRB 00003888 (заключение № 17–400). В этой главе описаны два комплементарных исследования. Первое исследование, проведенное на коже человека *ex vivo*, вызвало вопросы, для ответа на которые потребовалось второе исследование. Второе исследование проводилось на образцах кожи крыс.

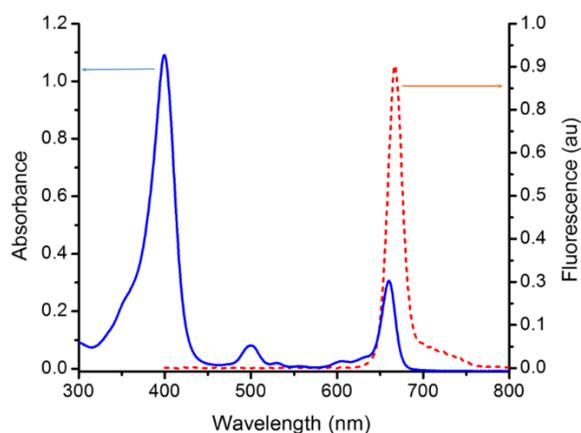
Для экспериментального протокола, проведенного на образцах кожи крыс *ex vivo*, были использованы 17 лабораторных беспородных крыс-самцов массой тела  $200 \pm 50$  г. Использование кожи крысы для экспериментов оправдано тем, что она зачастую используется как более доступная замена человеческой кожи в экспериментах по изучению проникновения лекарственных веществ [30]. Более того, её однородность и небольшая разница в толщине рогового слоя между образцами и отдельными особями обеспечивает более низкое стандартное отклонение проницаемости кожи по сравнению с кожей человека [249]. Кроме того, кожа крысы имеет сходство с кожей человека по оптическим свойствам на длинах волн, близких к используемым в данном эксперименте (на длине волны 400 нм  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  и показатель преломления составляют (примерно)  $3.7 / 3.8 \text{ см}^{-1}$ ,  $70 / 71 \text{ см}^{-1}$ , и  $1.45 / 1.42$ , для кожи человека / крысы, соответственно) [30], [241], [250].

Образцы кожи были взяты из области бедра каждого животного. Все животные содержались в Центре коллективного пользования Саратовского государственного медицинского

университета им. В.И. Разумовского в стандартных условиях вивария с фиксированным режимом освещения. С животными обращались в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986 г.) и Международными руководящими принципами биомедицинских исследований с участием животных.

### 2.2.3. Гибридная модель из кожи *ex vivo* и флуоресцентного геля

В научной литературе было показано [251], что использование гибридной модели, состоящей из образца кожи, помещенного на флуоресцентную пленку, дает возможность оценить динамику рассеяния кожи при спектральных измерениях, отслеживая изменения интенсивности сигнала, продуцируемого флуоресцентным нижним слоем. В нашем исследовании верхним слоем гибридной модели являлся образец *ex vivo* кожи человека, а нижний слой представлял собой флуоресцирующий, поглощающий и рассеивающий субстрат в виде геля, сделанного из агарозы (Invitrogen, США) в качестве основного материала (1% вес/объем), Интралипида-20% (Sigma-Aldrich, США) (5% объем/объем) в качестве рассеивателя, Чёрной туши (Lefranc & Bourgeois, Франция) (0.02% объем/объем) в качестве поглощающего компонента и Хлорина еб (Advanced BioChemicals, США) (Сeб, 500 мкмоль) в качестве экзогенного флуорофора (с полосами поглощения и испускания на ~400 и ~665 нм, соответственно (Рисунок 13)). Толщина нижнего слоя составляла 10 мм; его приведённый коэффициент рассеяния ( $\mu_s'$ ) и коэффициент поглощения ( $\mu_a$ ) составили  $5.8 \text{ мм}^{-1}$  [252] и  $0.08 \text{ мм}^{-1}$  [253], соответственно, на длине волны 663 нм. Такая толщина и введённые с помощью добавления Интралипида и чёрной туши оптические свойства (поглощение и рассеяние) были выбраны, чтобы обеспечить присутствие маркерного слоя, обладающего, как и патологические образования, рассеивающими и поглощающими свойствами, достижение которого фотонами определялось бы на спектрах по сигналу экзогенной флуоресценции.

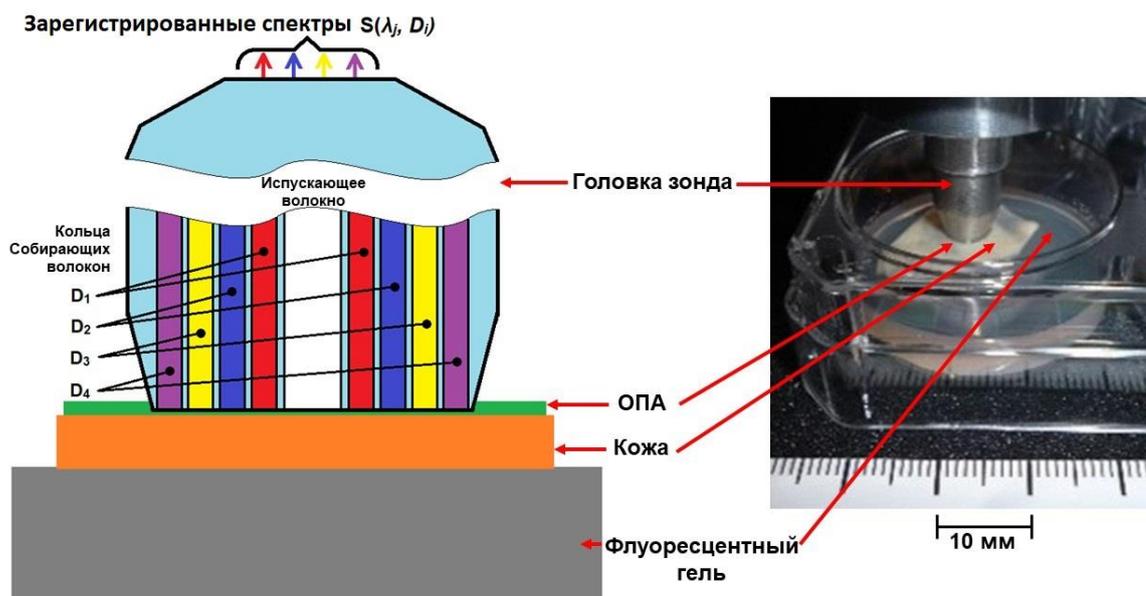


**Рисунок 13.** Спектры поглощения (сплошная линия) и флуоресценции (пунктирная линия) Хлорина еб в метаноле [254].

## 2.2.4. Измерение оптического просветления методом бимодальной спектроскопии с пространственным разрешением

### 2.2.4.1. Прибор для бимодальной спектроскопии

Устройство SpectroLive® использовалось для регистрации спектров диффузного отражения и многократно возбуждённой автофлуоресценции (подробные технические и метрологические характеристики см. в работах [255], [256]) с пространственным по поверхности кожи разрешением. Кратко, используемый многоволоконный оптический зонд состоял из одного центрального (диаметр сердцевины 600 мкм, числовая апертура  $NA=0.22$ ) волокна возбуждения, которое доставляло возбуждающий свет на поверхность кожи, и четырех колец по шесть собирающих волокон в каждом (диаметр сердцевины 200 мкм,  $NA=0.22$ ), расположенных на четырех различных расстояниях от возбуждающего волокна, т.е. различных расстояниях источник-приёмник (Source-Detector Separations (SDS)):  $D_1=400$  мкм,  $D_2=600$  мкм,  $D_3=800$  мкм и  $D_4=1000$  мкм, соответственно. Спектры излучения АФ с пространственным разрешением были зарегистрированы последовательно для пяти различных светодиодных источников с полосовым фильтром (полная ширина на полувысоте «Full Width at Half-Maximum»,  $FWHM = \sim 10$  нм) с центрами на длинах волн  $\lambda_1 = 365$  нм,  $\lambda_2 = 385$  нм,  $\lambda_3 = 395$  нм,  $\lambda_4 = 405$  нм и  $\lambda_5 = 415$  нм, соответственно. Данные длины волн позволяют возбуждать флуоресценцию различных элементов кожи, а также входящих в них веществ-флуорофоров (коллаген, эластин, и т. д.). Для получения спектров диффузного отражения с пространственным разрешением в качестве широкополосного (350–800 нм) источника света была использована ксеноновая импульсная лампа. Регистрация спектров АФ и диффузного отражения (отсюда следует термин «бимодальная» спектроскопия) проводилась четырьмя спектрометрами HRS-BD1 (Mightex, США) (по одному на каждое SDS) в спектральном диапазоне 350–800 нм, с оптическим разрешением 1.7, 4.1, 4.1, 9.7 нм-FWHM для каналов регистрации  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ , и  $D_4$ , соответственно.



**Рисунок 14.** Схематическое изображение (слева) и фотография (справа) экспериментальной гибридной модели кожа-гель и экспериментальной установки. Головка мультислоночного оптического зонда устройства Spectrolive® соприкасается с внешней поверхностью образца кожи *ex vivo*, лежащего на подложке из флуоресцентного геля. Поверхностно наносимые ОПА представлены зелёным цветом.  $S(\lambda_j, D_i)$  – спектры, полученные кольцами собирающих волокон на четырёх соответствующих SDS  $D_i$  с  $D_1=400$  мкм,  $D_2=600$  мкм,  $D_3=800$  мкм and  $D_4=1000$  мкм.

#### 2.2.4.2. Экспериментальный протокол

Протокол оптического просветления и спектральных измерений: в начальный момент времени  $t_0$  на наружную поверхность (эпидермис) образца кожи гибридной модели, лежащего на гелевой подложке, наносили 0.3 мл выбранного ОПА. Затем головка оптического зонда располагалась в контакте с эпидермисом кожи (Рисунок 14) и проводилась регистрация спектров: 5 спектров интенсивности АФ (соответствующих пяти вышеупомянутым длинам волн возбуждения  $\lambda_j$ ) и по одному спектру диффузного отражения для каждого расстояния SDS. В результате получалось по 24 спектра в каждый момент времени. Чтобы получить временную кинетику, эти спектральные измерения проводились каждые 4 минуты в течение 36 минут, то есть в моменты времени  $t=t_0+4k$  минут (при  $k = \{0,1,2,3,4,5,6,7,8,9\}$ ). Хотя полный процесс диффузии ОПА в кожу занимает несколько часов, было решено отслеживать изменения только в течение первых получаса, так как потенциальное клиническое использование методики иммерсионного просветления не требует завершения процесса из-за его длительности. Таким образом, учитывался только начальный эффект применения ОПА. Экспериментальные воздействия проводились в 4 различных условиях: условия 1 и 2, соответствующие применению ОПА 1 и ОПА 2, условие 3 – контрольные измерения с физиологическим раствором вместо ОПА, и условие 4, соответствующее «сухому» состоянию (при котором на кожу не наносился ни физиологический раствор, ни смеси ОПА). Под каждое из

экспериментальных воздействий было отведено по три образца кожи, за исключением контрольных измерений, в которых использовали четыре образца кожи. Для того чтобы улучшить отношение сигнал/шум, при каждой регистрации спектров выполнялось три измерения подряд с последующим усреднением.

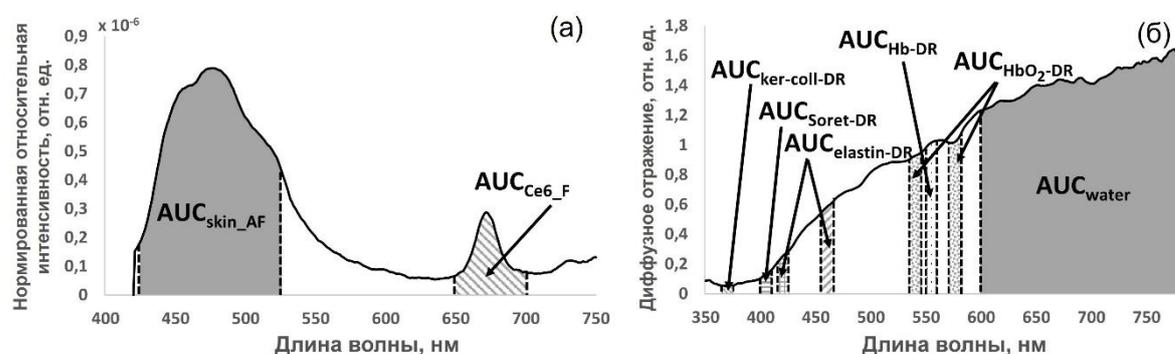
#### 2.2.4.3. Предварительная обработка и использование спектров флуоресценции и диффузного отражения

К необработанным спектрам интенсивности, полученным спектрометрами, сначала был применён медианный фильтр, чтобы исключить возможные высокоамплитудные пиковые артефакты, а фоновый спектр, зарегистрированный в тот же день при выключенных источниках света, был вычтен из всех зарегистрированных спектров. Затем спектры подвергались сглаживанию с помощью полиномиального фильтра Савицкого-Голея со спектральным окном шириной 20 нм. Чтобы учесть сложный спектральный отклик каждого элемента цепочки регистрации (включая волокно, источник света, фильтры и спектрометры), к спектрам были применены следующие операции. Для спектров диффузного отражения было подсчитано (попеременно для каждой длины волны) соотношение интенсивности диффузно отражённого тканью света и интенсивности, измеренной на отражательном стандарте (рассеиватель с плоской спектральной характеристикой, близкой к 100% отражения). Конечную единицу измерения по оси Y полученных спектров можно интерпретировать, как отношение света, диффузно отражённого кожей, по отношению к отражательному стандарту. Для сигнала автофлуоресценции к каждой длине волны была применена спектральная коррекция. Поправочный коэффициент устанавливался предварительно после калибровки на эталонной лампе. Наконец, был применён коэффициент для преобразования выходных данных в виде числа фотонов в спектр освещенности (в Вт/м<sup>2</sup>/нм) путем измерения падающего света возбуждения с помощью измерителя мощности.

Анализ данных заключался в расчете площади под кривой (Area Under Curve - AUC), то есть суммы интенсивностей в пределах заданной спектральной области. Основная цель использования AUC вместо пиков флуоресценции или поглощения заключалась в том, что анализ AUC позволяет нивелировать возможные артефакты, присущие узкой спектральной полосе (флуктуации амплитуды и т.п.), а также оценить общее изменение флуоресцентного сигнала (автофлуоресценции или экзогенного флуорофора) или изменение поглощения определенного хромофора [30].

Программное обеспечение MATLAB (R2018a, The Mathworks) использовалось для всех функций предварительной обработки спектральных данных и расчетов AUC. Для спектров АФ кожи для расчета  $AUC_{\text{skin\_AF}}$  был выбран спектральный диапазон 425–525 нм, представляющий

область эмиссии основных флуорофоров кожи [30]. Для хлорина е6 (Ce6), содержащегося в гелевой подложке использованной гибридной модели,  $AUC_{Ce6\_F}$  была рассчитана по ширине спектра излучения этого экзогенного флуорофора (Рисунок 15) в диапазоне 650–700 нм (Рисунок 15(a)). На этом иллюстративном графике отчетливо виден пик эмиссии Ce6. Стоит отметить, что в спектральную область, в которой подсчитывалась AUC экзогенного флуорофора, также входило значительное по объёму основание пика, чья флуктуация по площади в процессе эксперимента могла бы значительно исказить полученные результаты. Однако, это основание оставалось неизменным по площади в процессе измерений и его влияние на общую интенсивность было устранено нормировкой на начальное значение, давая в итоге лишь некоторый угловой коэффициент, не искажающий существенно экспериментальные результаты.



**Рисунок 15.** Пример (а) нормированного спектра относительной интенсивности флуоресценции (возбуждённой на  $\lambda_2=385$  нм), полученного на SDS D2 с соответствующими спектральными диапазонами рассчитываемых площадей под кривой  $AUC_{skin\_AF}$  для АФ (425-525 нм) и  $AUC_{Ce6\_F}$  для флуоресценции Хлорина е6 (650-700 нм); (б) спектр интенсивности ДО, полученный на SDS D2 с соответствующими спектральными диапазонами рассчитываемых площадей под кривой  $AUC_{ker-coll-DR}$  для пиков поглощения кератина и поперечных шнуров коллагена (365-375 нм),  $AUC_{Soret-DR}$  для полосы Соре гемоглобина (400-410 нм),  $AUC_{elastin-DR}$  для двух пиков поглощения эластина (415-425 нм и 455-465 нм),  $AUC_{HbO2-DR}$  для двух пиков поглощения оксигемоглобина (535-545 нм and 572-582 нм),  $AUC_{Hb-DR}$  для пика поглощения дезоксигемоглобина (550-560 нм) и  $AUC_{water}$  для одной из спектральных областей поглощения воды (600-784 нм).

Чтобы сравнить временную кинетику значений AUC, полученных для всех образцов кожи в 4 различных условиях воздействия, все значения AUC были нормированы на их начальные значения ( $t_0$ ) чтобы представить изменения во времени  $\Delta AUC$  (в %), определяемые как

$$\Delta AUC(t) = 100 \times \frac{AUC(t) - AUC(t_0)}{AUC(t_0)} \quad (5)$$

Для спектров диффузного отражения значения AUC были рассчитаны для четырех спектральных областей, соответствующих областям поглощения нескольких хромофоров кожи (Рисунок 15(б)): 365-375, 415-425, 455-465 и 600-784 нм, соответственно, соответствующих полосам поглощения (i) кератина и коллагена, двум полосам поглощения (ii and iii) эластина

[257] и поглощению (iv) воды (содержание воды определяет рассеивающие свойства кожи в спектральном диапазоне 600-800 нм) [30]. Также были рассчитаны значения в четырёх спектральных областях, соответствующих полосам поглощения гемоглобина: области 535-545 нм и 572-582 нм, связанные с участками поглощения оксигемоглобина, область 550-560 нм, связанная с пиком поглощения дезоксигемоглобина и область 400-410 нм, связанная с полосой Соре гемоглобина [30], [136]. Для оценки общего влияния экспериментального протокола на регистрируемые спектры диффузного отражения, величина AUC также была рассчитана в спектральном диапазоне 365–784 нм, соответствующим всей области наблюдения.

Нормированные усреднённые изменения АФ кожи и флуоресценции Себ через 36 минут эксперимента, соответствующие каждой длине волны возбуждения  $\lambda_j$  и каждому расстоянию источник-приёмник  $D_i$ , были рассчитаны для каждого экспериментального условия по Уравнению 6:

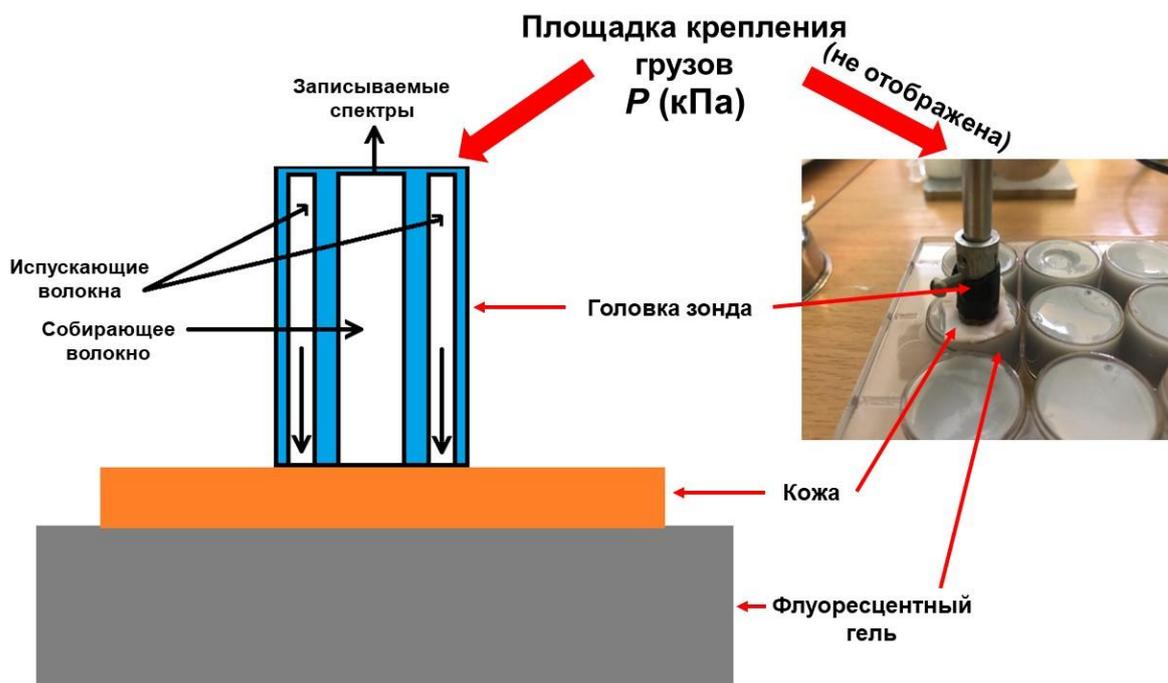
$$c(\lambda_j, D_i) = \frac{1}{n} \sum_n \frac{AUC_{t=t_0+36}(\lambda_j, D_i)}{AUC_{t=t_0}(\lambda_j, D_i)} \quad \text{при } i \in \{1..4\} \text{ и } j \in \{1..5\}, \quad (6)$$

где  $\sum_n$  – сумма по  $n=3$  образцам кожи (для контрольных измерений с физраствором  $n=4$ ),  $AUC_{t=t_0+36}$  – величина AUC после 36 минут экспериментального протокола,  $AUC_{t=t_0}$  – начальное значение AUC.

### 2.2.5. Исследование эффекта давления

Для исследования эффекта давления, вызванного контактом спектрального зонда с кожей, был выполнен следующий протокол. Подкожный слой жира образцов кожи крысы *ex vivo* ( $2 \times 2$  см<sup>2</sup>) был предварительно удалён. Затем, каждый образец был помещён на 15 мм слой 3%-агарозного флуоресцентного геля (как описано в Разделе 2.2.3). Средняя начальная (т.е. ненагруженная) толщина всех образцов кожи была измерена и составила  $738 \pm 66$  мкм. Оптический зонд диаметром 6.35 мм (R400-7-VIS/NIR, Ocean Optics, США) был помещён в контакте с кожей в центре исследуемого образца (Рисунок 16). В отличие от зонда, описанного в разделе 2.2.4.1., этот зонд состоял из одного центрального (диаметр сердцевины 400 мкм, числовая апертура NA=0.22) собирающего волокна, принимающего свет, излучаемый окружающим кольцом из шести возбуждающих волокон (диаметр сердцевины 400 мкм, NA = 0.22), расположенных на SDS ~500 мкм. Пиковая длина волны возбуждения составляла  $405 \pm 10$  нм, а оптическая мощность на торце зонда — 5 мВт. Спектры флуоресценции регистрировались спектрометром QE65000 (Ocean Optics, США) при различных давлениях, оказываемых зондом на кожу. К специальному держателю, встроенному в зонд, поочерёдно добавлялись двенадцать различных грузов для того, чтобы обеспечить приложение возрастающего (общего) давления в диапазоне от 82 кПа (начальный момент времени, собственный вес зонда) до 269 кПа.

Спектральные измерения выполнялись с 1-минутной задержкой после каждого приложения новой нагрузки, чтобы учесть вязкоупругое поведение образцов кожи. Исследование проведено для семи образцов.



**Рисунок 16.** Схематическое изображение (слева) и фото (справа) экспериментальной установки. Головка оптического зонда с площадкой для крепления грузов находится в контакте с центром образца кожи, помещенного поверх подложки из флуоресцентного геля.

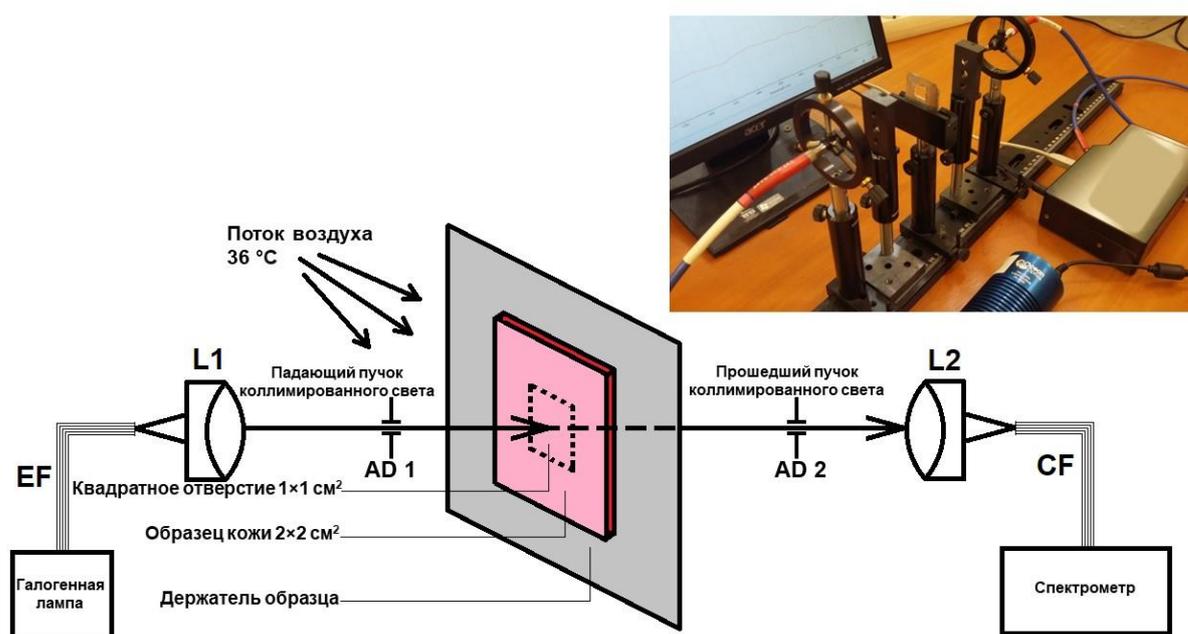
### 2.2.6. Изучение влияния дегидратации кожи *ex vivo* на спектральные измерения

Чтобы исследовать изменения, наблюдаемые в спектральном сигнале во время экспериментов на коже человека, возможно, связанные с «естественной» дегидратацией образцов кожи *ex vivo*, десять ( $n=10$ ) образцов кожи крысы *ex vivo* ( $2 \times 2$  см<sup>2</sup>) с предварительно удаленным слоем жировой ткани были помещены на специальный держатель и приклеены с помощью цианакрилатного клея по периметру квадратного отверстия размером  $1 \times 1$  см<sup>2</sup>, показанном на Рисунке 17. Помещенный на держатель образец кожи был расположен перпендикулярно коллимированному пучку излучения, полученному от широкополосного галогенного источника света HL-2000 (Ocean Optics, США) с помощью оптического волокна с диаметром сердцевины 400 мкм и числовой апертурой 0.22 (QP400-1-VIS-NIR, Ocean Optics, США), соединенного с ахроматическим коллиматорным объективом (74-ACR, Ocean Optics, США). Свет, прошедший через образец кожи, собирался аналогичным волокном с коллимирующей линзой и преобразовывался в спектры интенсивности в двух спектральных диапазонах UV-VIS и VIS-NIR с помощью спектрометров USB4000-UV-VIS и USB4000-VIS-NIR (Ocean Optics, США), соответственно. Посередине между испускающим светом волокном и

образцом, а также между собирающим волокном и образцом были установлены апертурные диафрагмы. Спектральные данные регистрировались каждые 10 минут в течение «естественного» высушивания образца. Чтобы ускорить процесс дегидратации, поток теплого воздуха (~36°C) был направлен на дермальную сторону образца кожи в течение всего эксперимента. Параллельно этому, измерения толщины образцов кожи выполнялись до начала спектральных измерений и в каждый из пяти моментов времени измерений, с начального момента  $t_0$  до  $t_0+40$  мин. Чтобы количественно определить потерю воды из-за обезвоживания, для каждого образца кожи также была измерена начальная и конечная масса. Значения коэффициента ослабления света  $\mu_t$ , представляющего собой сумму коэффициентов рассеяния и поглощения, были рассчитаны с учётом длин волн и моментов времени измерения по формуле

$$\mu_t = -\frac{\ln\left(\frac{I_t(t,\lambda)}{I_0(t,\lambda)}\right)}{l(t)}, \quad (7)$$

где  $I_0$  – интенсивность падающего света в зависимости от момента времени  $t$  и длины волны  $\lambda$ ,  $I_t$  – интенсивность света, прошедшего через образец кожи в зависимости от момента времени  $t$  и длины волны  $\lambda$ ,  $l$  – толщина образца кожи в зависимости от момента времени  $t$ .



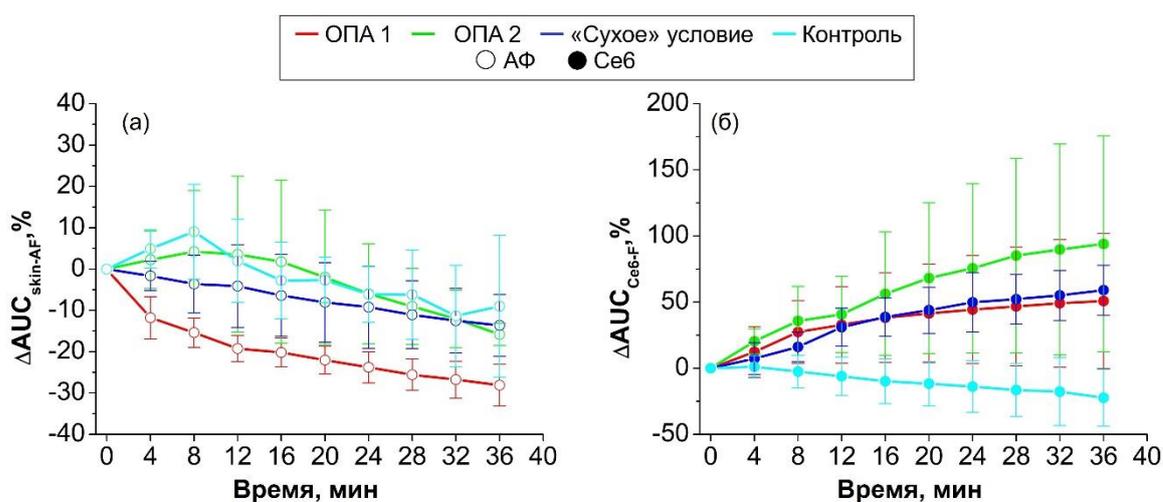
**Рисунок 17.** Схематическое изображение экспериментальной установки для изучения *ex vivo* модификаций спектров коллимированного пропускания, связанных с дегидратацией кожи. Падающий пучок коллимированного света, поступающий от источника света с испускающим волокном (EF) и коллимирующей линзой (L1), проходил через образец кожи, закрепленный на квадратном отверстии держателя. Прошедший через кожу свет собирался спектрометрами с помощью коллиматорной линзы (L2) и собирающего волокна (CF). Две апертурные диафрагмы (AD 1 и AD 2) устанавливались посередине между испускающим светом волокном и образцом и между собирающим волокном и образцом.

## 2.3. Результаты и обсуждение

### 2.3.1. Мониторинг воздействия оптического просветления на кожу человека *ex vivo* с помощью оптической спектроскопии

#### 2.3.1.1. Анализ данных флуоресценции

Иллюстративные временные кривые вариаций AUC, рассчитанные по спектрам интенсивности АФ ( $\Delta AUC_{\text{skin-AF}}$ ) и флуоресценции Хлорина еб ( $\Delta AUC_{\text{Ce6-F}}$ ), возбуждённых на длине волны 385 нм, для 13 образцов человеческой кожи, изображены с соответствующими значениями стандартного отклонения на Рисунке 18 для ОПА 1 ( $n=3$ ), ОПА 2 ( $n=3$ ), контрольных измерений ( $n=4$ ) и «сухого» ( $n=3$ ) условия. ОПА вызвали просветление кожи, так как флуоресценция геля, зарегистрированная из-под образца кожи, постоянно увеличивалась от  $t_0$  до  $t_0+36$  минут. Просветление образца кожи можно также определить по постоянному уменьшению интенсивности АФ образцов кожи [30] в течение 36 минут. После 36 минут нанесения ОПА 1 или ОПА 2 можно наблюдать усиленное проникновение света, выраженное в увеличении  $AUC_{\text{Ce6-F}}$  со временем (продуцируемое нижним слоем флуоресцентного геля) на 50% и 95%, соответственно (Рисунок 18(б)), а также в снижении  $AUC_{\text{skin-AF}}$  (от верхнего слоя гибридной модели, представленного кожей) на 28% и 15%, соответственно (Рисунок 18(а)). Полученные результаты имеют относительно высокие значения стандартного отклонения из-за небольшой статистической выборки и биологических вариаций образцов кожи человека (вариации толщины и морфологии). Но среднее значение стандартного отклонения для всех экспериментальных условий и моментов времени составило 11%.

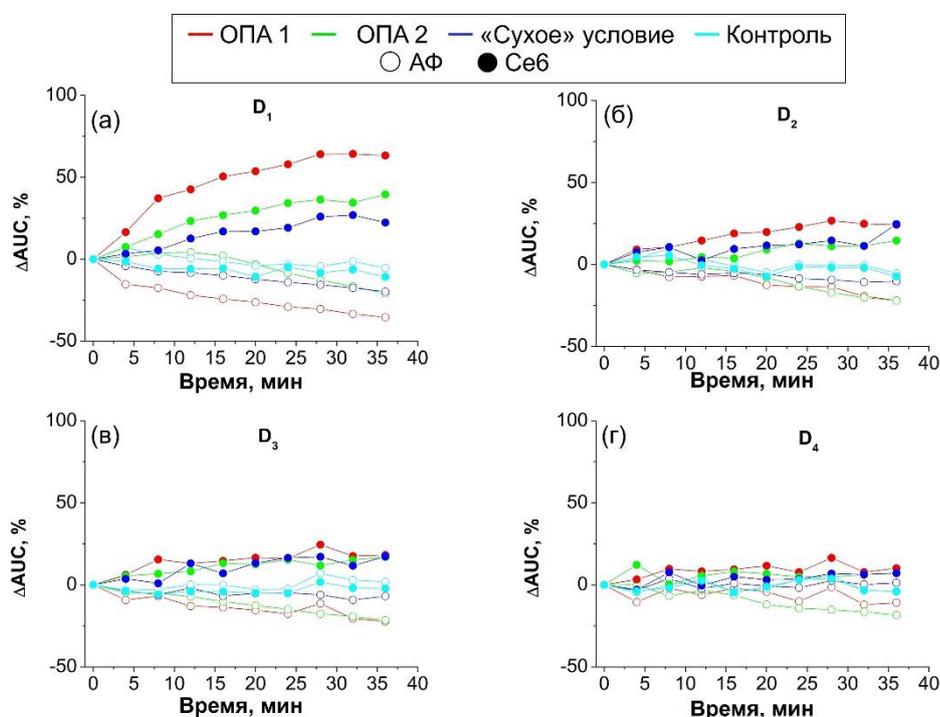


**Рисунок 18.** Нормированная кинетика изменений AUC со столбиками стандартного отклонения (а) интенсивности АФ кожи человека *ex vivo* (пустые кружки) и (б) флуоресценции геля (закрашенные кружки) в каждый момент времени от 0 до 36 минут для ОПА 1 (красные линии, ПЭГ/ПГ/Сахароза), ОПА 2 (зелёные линии, ПЭГ/ДМСО), контрольных измерений с физиологическим раствором (голубые линии) и «сухого» условия (синие линии), возбуждённых на длине волны  $\lambda=385$  нм, измеренных на расстоянии источник-приёмник  $D_1$ .

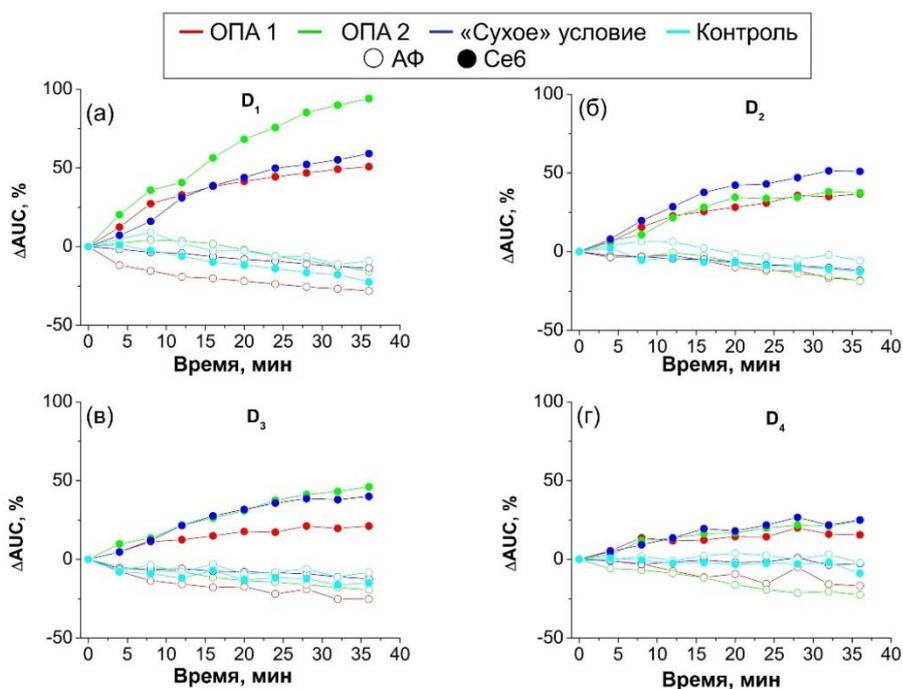
Как и ожидалось, контрольные измерения с использованием физиологического раствора не привели к увеличению регистрируемой интенсивности флуоресценции Себ, т. е. не вызвали заметного эффекта просветления. Более того, эффект был обратным (снижение регистрируемого сигнала флуоресценции Себ). По-видимому, это вызвано воздействием физраствора, препятствующего дегидратации образцов и, следовательно, снижению рассеяния. Также, дополнительные тесты на фотообесцвечивание, проведённые на чистом слое геля, показали снижение на ~5-10% интенсивности флуоресценции Себ в процессе измерений, что также может быть связано с наблюдаемыми в контрольном измерении результатами.

Однако в «сухих» условиях были получены те же результаты, что и при применении ОПА: Снижение  $\Delta AUC_{\text{skin-AF}}$  на 14% и повышение  $\Delta AUC_{\text{Ce6-F}}$  на 60%. Это послужило поводом дополнительно исследовать дегидратацию кожи (см. Раздел 2.3.3).

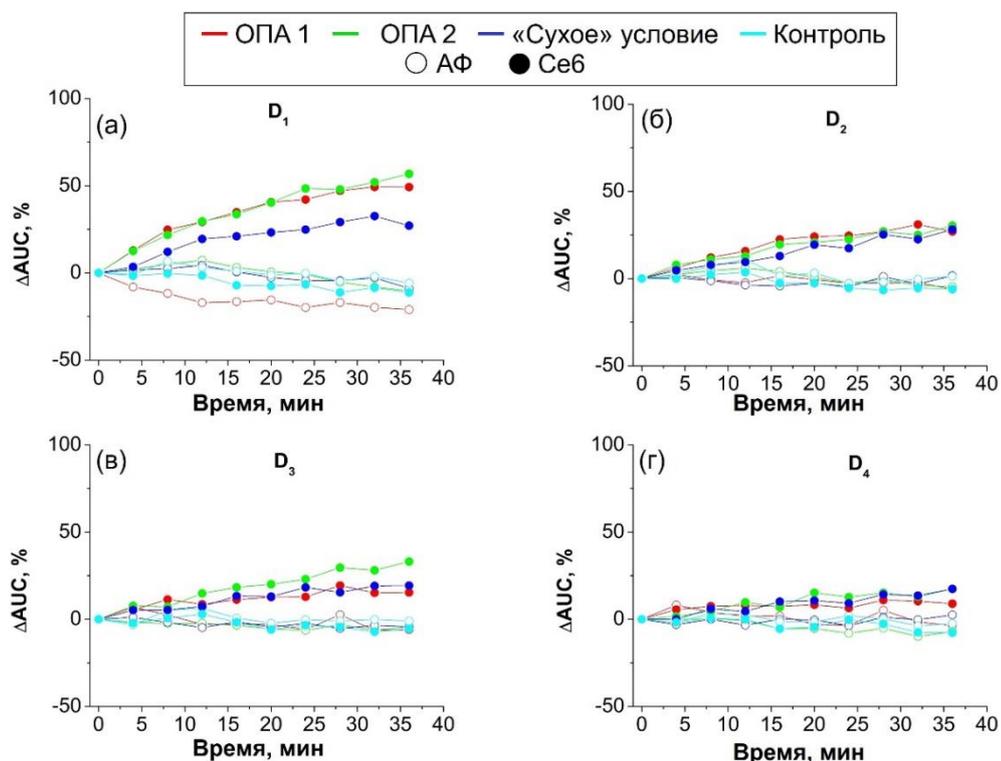
Репрезентативные временные кривые для всех  $D_i$  значений  $\Delta AUC_{\text{skin-AF}}$  и  $\Delta AUC_{\text{Ce6-F}}$ , полученные на длине волны возбуждения 365 нм на  $n=13$  образцах человеческой кожи представлены в Рисунке 19 для ОПА 1, ОПА 2, контрольных и «сухих» условий. Аналогичные графики, но для длин волн возбуждения 385 нм, 395 нм, 405 нм и 415 нм представлены соответственно на Рисунке 20, Рисунке 21, Рисунке 22 и Рисунке 23. Столбики стандартного отклонения были удалены с этих рисунков, чтобы кривые были хорошо различимы (среднее значение стандартного отклонения составляло 11%).



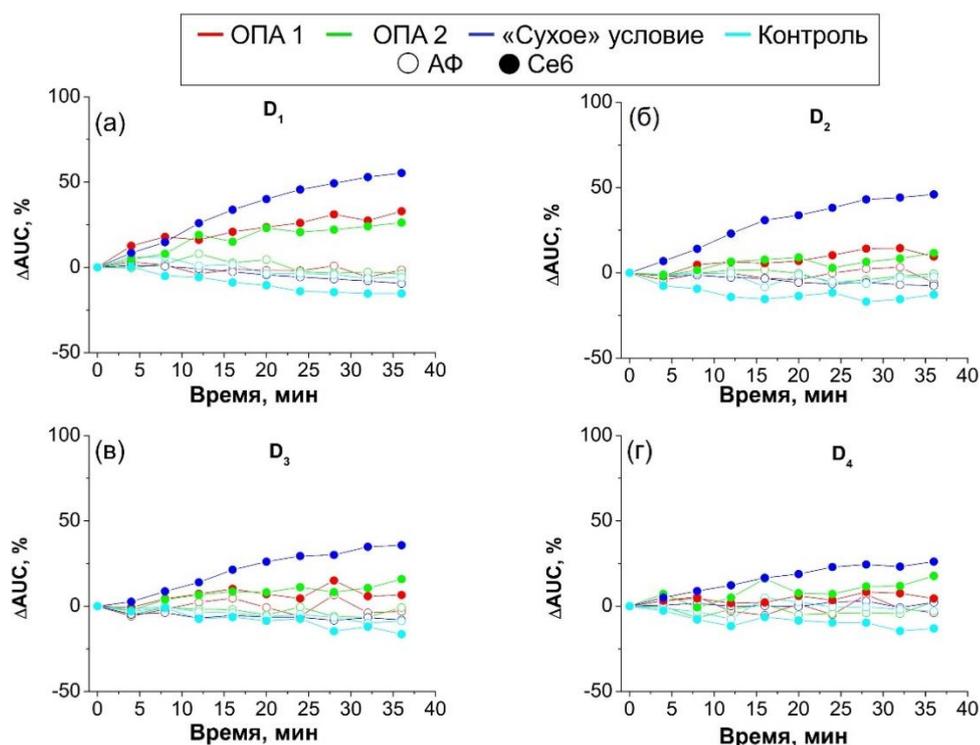
**Рисунок 19.** Нормированная усреднённая кинетика изменений AUC спектров АФ кожи человека *ex vivo* (пустые кружки) и флуоресценции Себ (закрашенные кружки) для ОПА 1 (красные линии, ПЭГ/ПГ/Сахароза), ОПА 2 (зелёные линии, ПЭГ/ДМСО), контрольных измерений с физиологическим раствором (голубые линии) и «сухого» условия (синие линии), возбуждённых на длине волны  $\lambda=365$  нм, измеренных на каждом SDS: (а)  $D_1$ , (б)  $D_2$ , (в)  $D_3$  and (г)  $D_4$ .



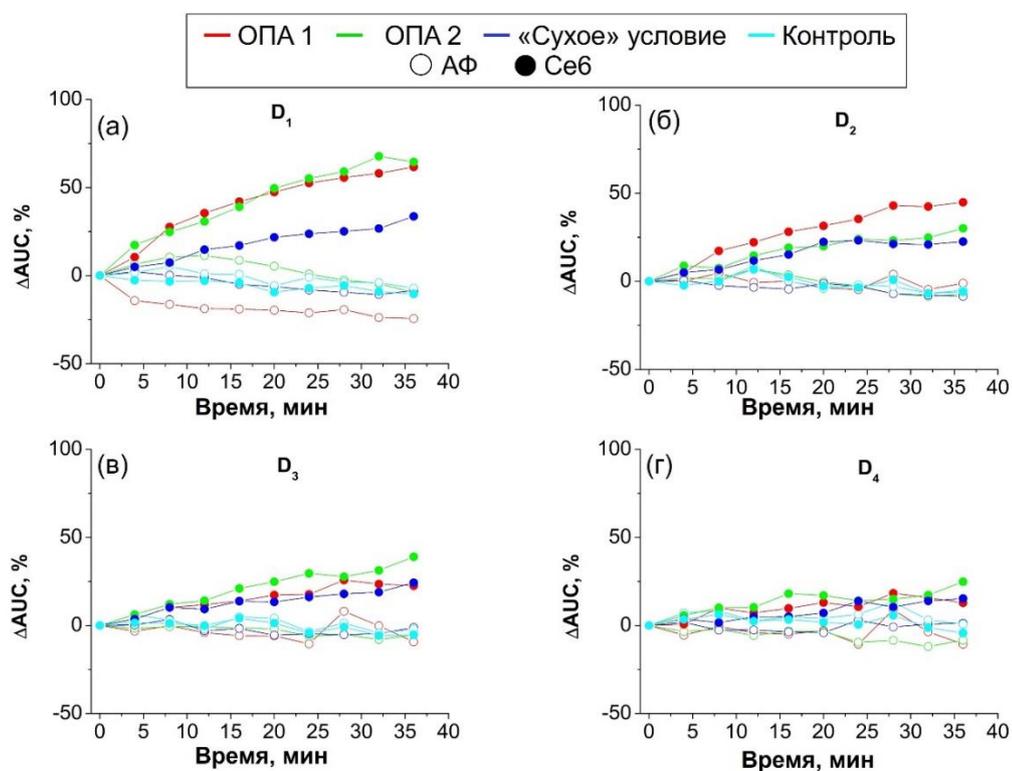
**Рисунок 20.** Нормированная усреднённая кинетика изменений AUC спектров АФ кожи человека *ex vivo* (пустые кружки) и флуоресценции Себ (закрашенные кружки) для ОПА 1 (красные линии, ПЭГ/ПГ/Сахароза), ОПА 2 (зелёные линии, ПЭГ/ДМСО), контрольных измерений с физиологическим раствором (голубые линии) и «сухого» условия (синие линии), возбуждённых на длине волны  $\lambda=385$  нм, измеренных на каждом SDS: (а)  $D_1$ , (б)  $D_2$ , (в)  $D_3$  and (г)  $D_4$ .



**Рисунок 21.** Нормированная усреднённая кинетика изменений AUC спектров АФ кожи человека *ex vivo* (пустые кружки) и флуоресценции Себ (закрашенные кружки) для ОПА 1 (красные линии, ПЭГ/ПГ/Сахароза), ОПА 2 (зелёные линии, ПЭГ/ДМСО), контрольных измерений с физиологическим раствором (голубые линии) и «сухого» условия (синие линии), возбуждённых на длине волны  $\lambda=395$  нм, измеренных на каждом SDS: (а)  $D_1$ , (б)  $D_2$ , (в)  $D_3$  and (г)  $D_4$ .



**Рисунок 22.** Нормированная усреднённая кинетика изменений AUC спектров АФ кожи человека *ex vivo* (пустые кружки) и флуоресценции Себ (закрашенные кружки) для ОПА 1 (красные линии, ПЭГ/ПГ/Сахароза), ОПА 2 (зелёные линии, ПЭГ/ДМСО), контрольных измерений с физиологическим раствором (голубые линии) и «сухого» условия (синие линии), возбуждённых на длине волны  $\lambda=405$  нм, измеренных на каждом SDS: (а) D<sub>1</sub>, (б) D<sub>2</sub>, (в) D<sub>3</sub> and (г) D<sub>4</sub>.



**Рисунок 23.** Нормированная усреднённая кинетика изменений AUC спектров АФ кожи человека *ex vivo* (пустые кружки) и флуоресценции Себ (закрашенные кружки) для ОПА 1 (красные линии, ПЭГ/ПГ/Сахароза), ОПА 2 (зелёные линии, ПЭГ/ДМСО), контрольных измерений с физиологическим раствором (голубые линии) и «сухого» условия (синие линии), возбуждённых на длине волны  $\lambda=415$  нм, измеренных на каждом SDS: (а) D<sub>1</sub>, (б) D<sub>2</sub>, (в) D<sub>3</sub> and (г) D<sub>4</sub>.

Из рисунков 19, 20, 21, 22 и 23 видно, что ОПА 2 в целом оказывает большее просветляющее воздействие, чем ОПА 1, если рассматривать увеличение флуоресценции Себ, особенно зарегистрированной на расстоянии источник-приёмник  $D_1$ , но также и на  $D_2$ ,  $D_3$  и  $D_4$ : например, увеличение на 25% сигнала от  $D_4$ , возбуждённого на 385 нм (против 15% увеличения для ОПА 1) или увеличение на 39% сигнала от  $D_3$ , возбуждённого на 415 нм (против 22% увеличения для ОПА 1). Для обоих ОПА осмотический эффект, вызванный их поверхностным нанесением, а также последующее согласование показателей преломления после их диффузии в кожу вызвали снижение рассеяния кожи. В результате, в коже поглощается меньше фотонов: больше фотонов сквозь кожу и обратно и, следовательно, повышается эффективность переноса излучения экзогенной флуоресценции через кожу [30], [32]–[34]. Напротив, если рассматривать АФ кожи, ОПА 1, по-видимому, вызывает эффект просветления в той же степени, что и ОПА 2, или даже немного выше, так как интенсивность АФ кожи при возбуждении на 385 нм, например, демонстрирует снижение на 28% на  $D_1$  (по сравнению с 18%-снижением при применении ОПА 2). Для спектров, зарегистрированных на  $D_2$ ,  $D_3$  and  $D_4$ , на всех длинах волн  $\lambda_j$  возбуждения, среднее снижение интенсивности АФ кожи в целом является похожим и близким по значению после 36 минут (снижение на 11%) как для ОПА 1, так и для ОПА 2.

Совокупный анализ снижения сигнала автофлуоресценции, возбуждённой пятью длинами волн, в процессе просветления, даёт возможность оценить эффект просветления по глубине даже без анализа результатов с пространственным разрешением. Известно, что по мере увеличения длины волны возбуждающего флуоресценцию излучения в формировании спектра флуоресценции вовлекаются новые флуорофоры, располагаемые в более глубоких слоях кожи [30]. Таким образом, неизменно наблюдая снижение общей интенсивности автофлуоресценции в процессе просветления даже при увеличении длины волны возбуждения можно сделать вывод о том, что снижение рассеяния при воздействии ОПА затрагивает более глубокие слои кожи (ретикулярная дерма) и их основные структурные компоненты и флуорофоры (коллаген, эластин). Данная комбинация длин волн возбуждения при переносе данной методики в клинические условия способна повысить специфичность анализа спектрального метода.

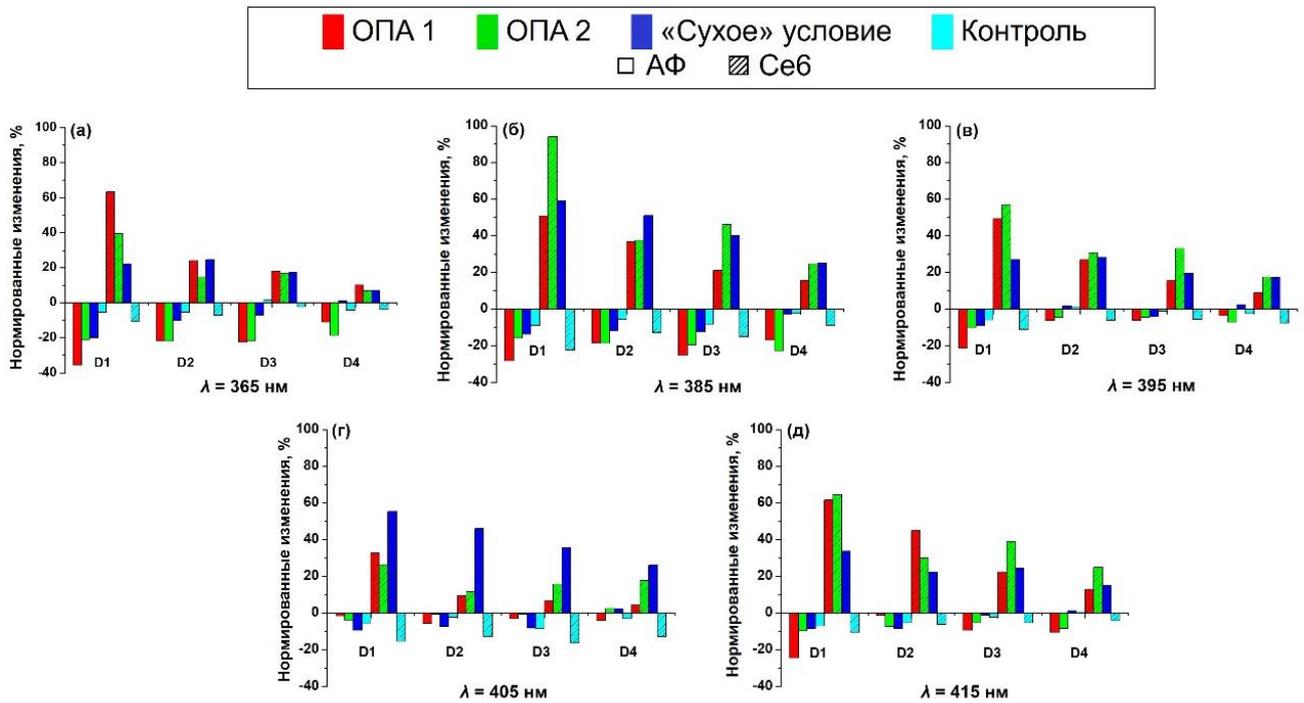
«Сухое» состояние показало, что образцы кожи *ex vivo* подверглись уплотнению и сжатию, что вызвало эффект, схожий с просветлением [26], [30], [258], [259]. Стоит также отметить, что увеличение флуоресценции Себ, возбуждённой на длине волны 405 нм в «сухом» состоянии для всех  $D_i$  явно больше, чем у обоих ОПА 1 и ОПА 2, что, по-видимому, связано с дегидратацией кожи и тем, что основной пик поглощения Хлорина е6 расположен примерно на 403 нм.

Нормированные усреднённые изменения  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и  $AUC_{\text{Себ-F}}$  после 36 минут эксперимента для всех длин волн возбуждения  $\lambda_j$  и всех SDS  $D_i$  представлены на Рисунке 24. На

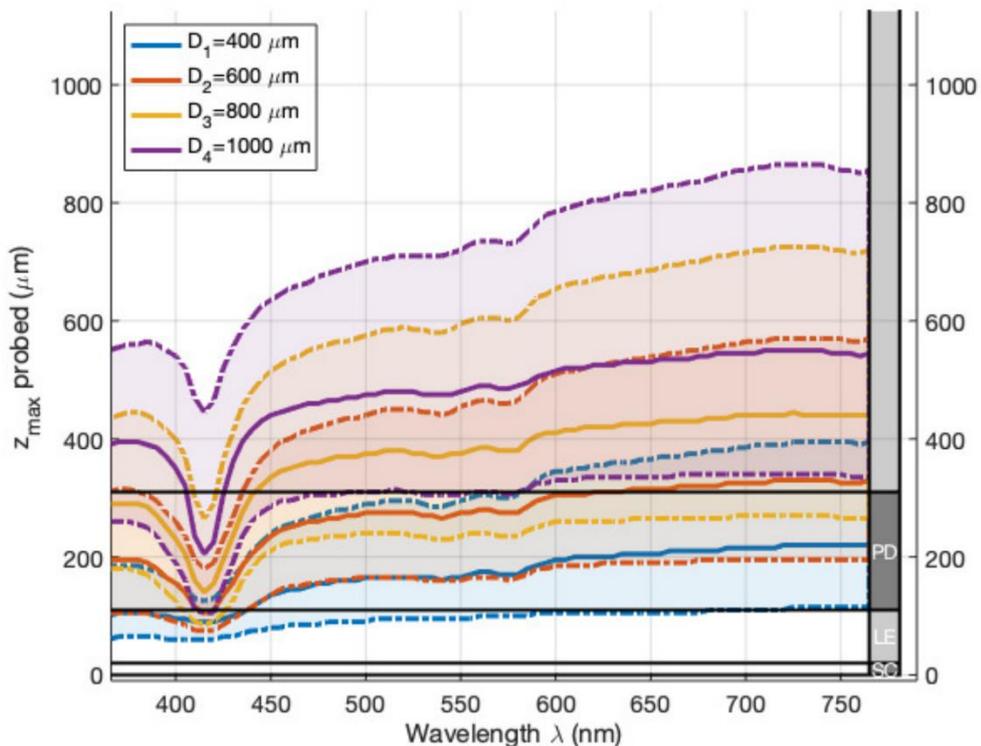
этом рисунке пространственное разрешение демонстрирует, что оптическое просветление оказывает большее влияние на интенсивность всех спектров на более коротких SDS, чем на более длинных: увеличение сигнала (соответственно, снижение) больше на  $D_1$ , чем на  $D_4$  для флуоресценции Себ (АФ кожи, соответственно). Поскольку более короткие расстояния SDS в большей степени чувствительны к верхнему слою кожи, этого и следовало ожидать, так как основным оптическим барьером является эпидермис и даже в большей степени верхний слой эпидермиса, т. е. роговой слой. Также, эти результаты находят подтверждение в работе [260], где *Colas* и соавторы промоделировали методом Монте-Карло глубину проникновения диффузно рассеянных фотонов в зависимости от расстояния источник-приёмник. Особую ценность эта работа наших коллег в анализе данного эксперимента представляет по причине того, что в качестве спектрального зонда при моделировании была использована геометрия прибора SpectroLive, использованного в нашем эксперименте. В качестве модели авторы использовали пятислойную модель кожи, с соответствующими оптическими свойствами (роговой слой, эпидермис, ретикулярная и папиллярная дерма, гиподерма).

Результаты моделирования методом МК глубины проникновения фотонов в 5-слойную ткань в зависимости от расстояния источник-приёмник представлены на Рисунке 25. Из рисунка хорошо видно, что максимальная глубина проникновения света, регистрируемая приёмником на расстоянии  $D_1$ , ограничена папиллярной дермой, а на расстоянии  $D_4$  – глубокой ретикулярной дермой. Причём, глубина, которую достигает 50% фотонов излучения для  $D_4$  (определяется квантилями), сопоставима со средней толщиной образцов кожи, использованных нами в двухслойной модели. Таким образом, можно сделать вывод о том, что эффект снижения рассеяния в результате просветления кожи сильнее сказывается на увеличении  $AUC_{\text{Себ}}$  для расстояния  $D_1$ , так как фотоны, достигающие границы образца кожи и флуоресцентного геля, могут и без просветления регистрироваться на расстоянии источник-приёмник  $D_4$ . В процессе просветления, когда рассеяние кожи значительно снижается, глубина проникновения света, регистрируемого малым расстоянием  $D_1$ , также повышается (так как она зависит от рассеяния кожи), и гораздо больше фотонов возбуждающего излучения достигает слоя флуоресцентного геля, что не так сильно меняется в процессе просветления для  $D_4$ .

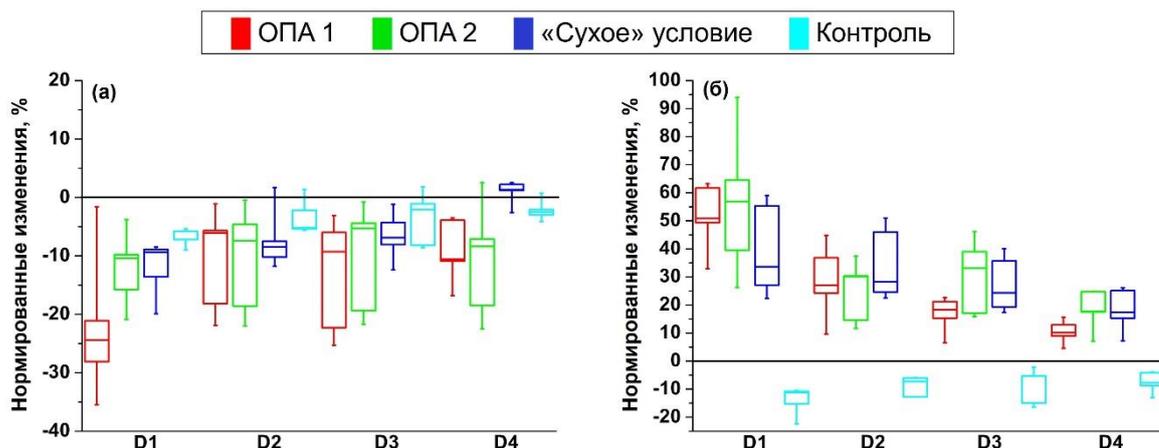
Чтобы пронаблюдать общее влияние каждого экспериментального условия на зарегистрированные спектры и сравнить результаты экспериментальных условий между собой, были построены ящичковые диаграммы для нормированных усредненных изменений  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и  $AUC_{\text{Себ-F}}$  после 36 минут эксперимента, сгруппировав все значения по пяти длинам волн возбуждения  $\lambda_j$ , для каждого условия и каждого расстояния  $D_i$  (Рисунок 26).



**Рисунок 24.** Нормированные изменения  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и  $AUC_{\text{Себ-F}}$  (в процентах) через 36 минут экспериментального протокола для всех 4 экспериментальных условий (ОПА 1, ОПА 2, «сухое» и контрольное), для каждого расстояния источник-приёмник ( $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$  и  $D_4$ ) и каждой длины волны возбуждения  $\lambda_j$ : (а) 365 нм, (б) 385 нм, (в) 395 нм, (г) 405 нм и (д) 415 нм.



**Рисунок 25.** Максимальные глубины проникновения фотонов в модели здоровой кожи со стандартными толщинами рогового слоя и живого эпидермиса и стандартным содержанием крови в дерме в зависимости от длины волны и расстояний источник-приёмник. Сплошные и штрихпунктирные линии представляют собой значения медианы и квартили соответственно. Правая колонка и черные горизонтальные линии иллюстрируют положение границы между слоями (SC: роговой слой; LE: живой эпидермис; PD: папиллярная дерма; RD: ретикулярная дерма; SF: подкожный жир (здесь не представлен)) [260].



**Рисунок 26.** Ящичковые диаграммы нормированных изменений (а)  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и (б)  $AUC_{\text{Ce6-F}}$  через 36 минут экспериментального протокола, сгруппированные по всем длинам волн возбуждения  $\lambda_j$  для каждого экспериментального условия (ОПА 1, ОПА 2, «сухое» и контрольное) и каждой дистанции ( $D_i$ ). Значениями в ящиках являются первая квартиль, медиана и третья квартиль, усы соответствуют минимальному и максимальному значению.

Для ОПА 1 (ПЭГ/ПГ/Сахароза) на  $D_1$  наблюдалось в среднем 24%-снижение  $AUC_{\text{skin-AF}}$ , что примерно в 2 раза выше, чем у ОПА 2 (ПЭГ/ДМСО) (среднее снижение 11%). Вероятно, это связано с присутствием в ОПА 1 сахарозы, обладающей сильными гиперосмотическими свойствами [33]. Удаление свободной воды из эпидермального и дермального слоев приводит к снижению выраженности АФ кожи. По данным литературы, ПГ широко используется в качестве усилителя проницаемости, способного сольубилизовать межклеточные липиды рогового слоя, облегчая тем самым процесс дегидратации [261]. В результате поверхностные слои кожи, вероятно, подверглись более сильному воздействию, чем при применении ОПА 2 через 36 минут. Но, с другой стороны, анализ спектров, полученных более удалёнными регистрирующими волокнами ( $D_3$  и  $D_4$ ), даёт противоположный результат. Здесь снижение  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и увеличение  $AUC_{\text{Ce6-F}}$  более заметно при использовании ОПА 2. Такое различие в значениях на более удалённых SDS, вероятно, связано с воздействием ДМСО - гидрофильного растворителя, способного изменять конформацию межклеточного кератина с  $\alpha$ -спирали на  $\beta$ -лист и взаимодействовать с липидным бислоем рогового слоя кожи человека, тем самым облегчая и увеличивая скорость диффузии ОПА вглубь кожи [30], [34], [262]. По сравнению с ОПА 1, где в качестве энхансера используется ПГ, объемная концентрация ДМСО в качестве энхансера в ОПА 2 была в 4 раза выше. Этот факт, вероятно, привел к более глубокой диффузии смеси ПЭГ/ДМСО (ОПА 2) в кожу и к более значительному взаимодействию с волокнами коллагена и эластина, что дало лучший эффект оптического просветления через 36 минут.

При поверхностном просветлении кожи человека *ex vivo* динамика изменения регистрируемой флуоресценции зависит от расстояния источник-приёмник, что видно из иллюстративной кинетики (Таблица 3)  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и  $AUC_{\text{Ce6-F}}$  при возбуждении на длине волны 395 нм и просветлении смесью ОПА 1. Сигнал автофлуоресценции снижается со временем, а сигнал экзогенной флуоресценции повышается, причём эти тенденции сильнее проявляются на расстоянии  $D_1$ , чем на  $D_4$ .

**Таблица 3.** Кинетика  $AUC_{\text{skin-AF}}$  и  $AUC_{\text{Ce6-F}}$  при возбуждении на длине волны 395 нм и просветлении смесью ОПА 1.

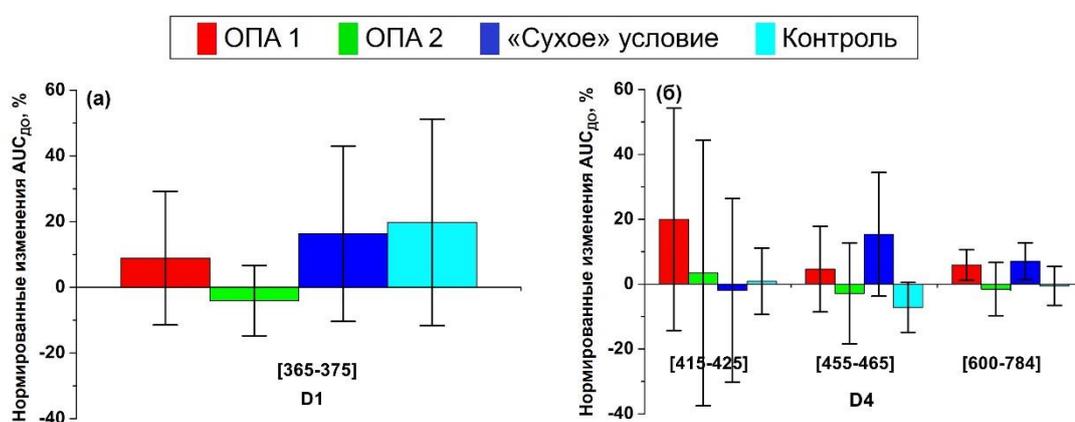
<b><math>AUC_{\text{skin-AF}}</math></b>								
<b>Время, мин</b>	<b><math>D_1</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>	<b><math>D_2</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>	<b><math>D_3</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>	<b><math>D_4</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>4</b>	-0,15	0,06	-0,03	0,03	-0,09	0	-0,11	0,01
<b>8</b>	-0,18	0,07	-0,08	0,12	-0,07	0,07	-0,02	0,04
<b>12</b>	-0,22	0,05	-0,07	0,18	-0,13	0,11	-0,06	0,06
<b>16</b>	-0,24	0,06	-0,07	0,21	-0,14	0,13	-0,02	0,11
<b>20</b>	-0,26	0,05	-0,13	0,17	-0,15	0,15	-0,04	0,14
<b>24</b>	-0,29	0,07	-0,14	0,19	-0,18	0,13	-0,10	0,04
<b>28</b>	-0,30	0,06	-0,14	0,16	-0,11	0,15	-0,02	0,15
<b>32</b>	-0,33	0,08	-0,19	0,17	-0,21	0,11	-0,12	0,03
<b>36</b>	-0,35	0,08	-0,22	0,18	-0,22	0,10	-0,11	0,06

<b><math>AUC_{\text{Ce6-F}}</math></b>								
<b>Время, мин</b>	<b><math>D_1</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>	<b><math>D_2</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>	<b><math>D_3</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>	<b><math>D_4</math></b>	<b><math>\pm SD</math></b>
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>4</b>	0,13	0,16	0,06	0,02	0,05	0,04	0,06	0,02
<b>8</b>	0,25	0,19	0,12	0,11	0,11	0,13	0,08	0,02
<b>12</b>	0,29	0,23	0,16	0,13	0,09	0,07	0,08	0,06
<b>16</b>	0,35	0,27	0,22	0,15	0,11	0,09	0,07	0,04
<b>20</b>	0,41	0,33	0,24	0,17	0,13	0,11	0,08	0,04
<b>24</b>	0,42	0,35	0,25	0,18	0,13	0,12	0,06	0,01
<b>28</b>	0,47	0,42	0,27	0,18	0,19	0,18	0,11	0,05
<b>32</b>	0,49	0,47	0,31	0,26	0,15	0,16	0,10	0,07
<b>36</b>	0,49	0,45	0,27	0,19	0,15	0,15	0,09	0,04

### 2.3.1.2. Анализ данных ДО

Нормированные изменения  $AUC_{ДО}$  кожи человека *ex vivo* через 36 минут (конец экспериментального протокола) для спектральных областей поглощения кератина, эластина/коллагена и воды представлены на Рисунке 27. Здесь нами предложено сосредоточить анализ диффузного отражения на данных, полученных на (i)  $D_1$  для кератина (365-375 нм), так как кератин расположен в верхнем слое (роговой слой), а более короткие расстояния источник-приёмник чувствительны к оптическим свойствам верхнего слоя (Рисунок 27(а)), и на данных, полученных на (ii)  $D_4$  для воды (спектральный диапазон 600-784 нм) и эластина/коллагена, поскольку и эластин, и коллаген расположены в более глубоких слоях (Рисунок 27(б)), к которым наиболее чувствительны большие расстояния источник-приёмник.

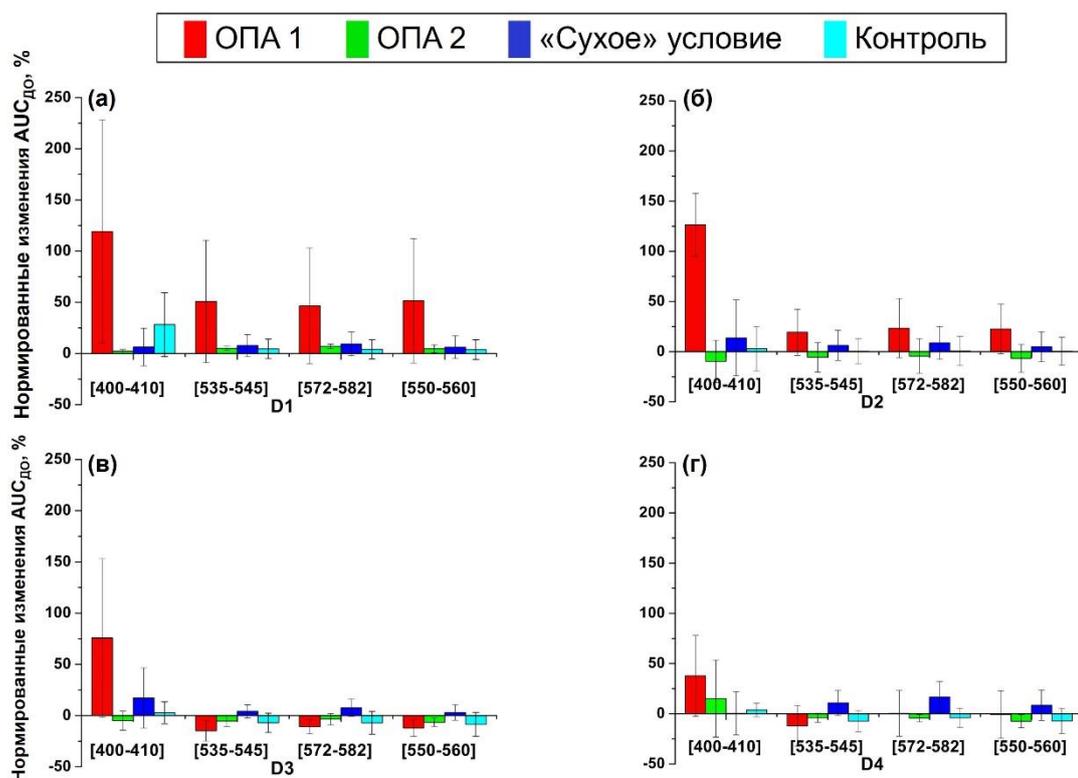


**Рисунок 27.** Нормированные изменения  $AUC_{ДО}$  через 36 минут экспериментального протокола для всех экспериментальных условий (ОПА 1, ОПА 2, «сухое» и контрольное) для (а) спектральной области поглощения кератина (365-375 нм) на расстоянии  $D_1$  и (б) спектральных областей поглощения воды (600-784 нм) и эластина/коллагена (415-425 нм и 455-465 нм) на расстоянии  $D_4$ .

ОПА 2 вызвал больший эффект просветления, чем ОПА 1, поскольку сигнал диффузного отражения принял тенденцию уменьшаться/увеличиваться при применении ОПА 2/ОПА 1, соответственно. Снижение сигнала отражения связано со снижением коэффициента рассеяния слоёв кожи, так как снижение рассеяния приводит и к снижению поглощения [30]. Более того, анализ нормированных изменений  $AUC_{ДО}$  через 36 минут для спектральных областей поглощения крови, представленных на Рисунке 26, позволяет предположить, что применение ОПА 1 даже вызвало увеличение рассеяния в верхних слоях кожи (эпидермис и дерма). Как мы видим, применение ОПА 1 вызывает значительное увеличение диффузного отражения на  $D_1$  (Рисунок 28(а)) во всех наблюдаемых спектральных областях, связанных с поглощением крови. На расстоянии  $D_2$  (Рисунок 28(б)), изменения в ДО, вызванные ОПА 1, не столь выражены (за исключением полосы Core), но всё же заметны. На больших расстояниях ( $D_3$  и  $D_4$  (Рисунок 28(в, г))), настолько заметный эффект ОПА 1 уже невозможно обнаружить. Вполне возможно,

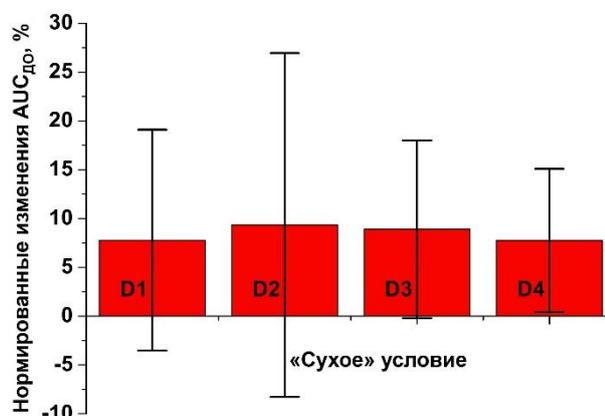
что такое поведение диффузного отражения на полосах поглощения крови для образцов, просветляемых смесью ОПА 1, может быть вызвано большим количеством остаточной крови внутри образцов. Об этом также говорит и сравнительно большой разброс стандартного отклонения. Вероятно, один или несколько образцов содержали в себе некоторое количество крови, чьё поглощение снизилось в процессе просветления за счёт снижения рассеяния, что привело к такому сильному росту на характерных полосах поглощения крови. Увеличение сигнала диффузного отражения в спектральной области поглощения кератина в контрольных измерениях, по-видимому, так же, как и в случае с сигналом флуоресценции, связано с комбинацией воздействия спектрального зонда, чьё давление на образец вызвало экструзию воды из всего объёма образца в процессе эксперимента, и эффекта регидратации поверхностных слоёв кожи физиологическим раствором, что привело к дополнительному рассогласованию показателей преломления поверхностных слоёв кожи и дермы. В результате это привело к увеличению общего рассеяния поверхностных слоёв контрольных образцов и, как следствие, к росту сигнала диффузного отражения поверхности, и снижению такового от глубоких слоёв кожи.

Для ОПА 2, обнаружено снижение на расстояниях  $D_2$  и  $D_3$  у всех четырёх спектральных областях, связанных с кровью, что, вероятно, связано с эффектом просветления.



**Рисунок 28.** Нормированные изменения AUC<sub>D0</sub> через 36 минут экспериментального протокола во всех экспериментальных условиях (ОПА 1, ОПА 2, «сухое» и контрольное) для полосы Core (400-410 нм), спектральных областей поглощения оксигемоглобина (535-545 нм и 572-582 нм) и спектральной области поглощения дезоксигемоглобина (550-560 нм) на дистанциях источник-приёмник D<sub>1</sub> (а), D<sub>2</sub> (б), D<sub>3</sub> (в) и D<sub>4</sub> (г).

Рассматривая гистограммы, построенные по всему исследуемому спектральному диапазону, представленные на Рисунке 29, можно отметить стабильное увеличение сигнала диффузного отражения на всех дистанциях при «сухих» условиях после 36 минут экспериментального протокола, что согласуется с литературными данными [30]. В этом спектральном диапазоне снижение поглощения воды, вызванное дегидратацией, способствует увеличению интенсивности диффузного отражения. Влияние изменения автофлуоресценции кожи при оптическом просветлении на регистрируемые спектры диффузного отражения при анализе не рассматривалось, так как флуоресцентные события в коже происходят примерно в 1000 раз реже, чем акты поглощения, не говоря уже об актах рассеяния, которые доминируют над поглощением [85]. Соответственно, вклад автофлуоресценции в интенсивность диффузного отражения ничтожно мал.



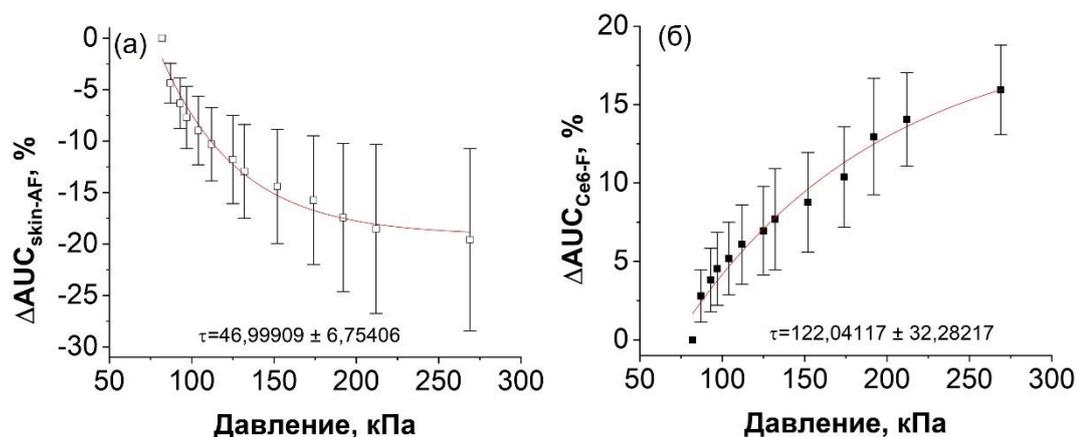
**Рисунок 29.** Нормированные изменения AUC<sub>до</sub> через 36 минут экспериментального протокола при «сухих» условиях для всего исследуемого спектрального диапазона (365-784 нм) на каждой дистанции источник-приёмник (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>).

### 2.3.2. Исследование влияния давления зонда

Поскольку результаты, полученные в эксперименте на коже человека, вызвали вопросы о влиянии давления зонда на образцы кожи и о высыхании кожи во время эксперимента, были проведены дополнительные измерения на образцах кожи крысы. Чтобы исследовать результаты, полученные в «сухих» условиях, были предложены 2 гипотезы появления результатов, схожих с результатами иммерсионного просветления: давление спектрального зонда и эффект дегидратации.

Изменения значений AUC, нормированные на начальный уровень давления -  $\Delta AUC(P)$ , были подсчитаны как функция давления  $P$ (kPa), оказываемого спектральным зондом на образцы кожи крысы *ex vivo*, в спектральных диапазонах 450-550 нм для АФ кожи и 650-700 нм для флуоресценции Хлорина еб (содержащегося в нижнем слое гибридной модели). Затем,

соответствующие величины  $\Delta AUC_{\text{skin\_AF}}$  и  $\Delta AUC_{\text{Ce6\_F}}$  были усреднены по семи ( $n=7$ ) *ex vivo* образцам кожи крысы. Полученные кривые представлены в Рисунке 30.



**Рисунок 30.** Зависимость нормированных изменений AUC от приложенного давления для (а) АФ кожи крысы *ex vivo* и (б) флуоресценции Хлорина е6. Средние значения и стандартное отклонение были подсчитаны для результатов, полученных на 7 образцах кожи ( $n=7$ ). Красные линии представляют собой аппроксимирующие экспоненциальные кривые, параметр  $\tau$  – экспоненциальная постоянная времени.

Непараметрический двусторонний критерий знаковых рангов Уилкоксона был применён к соответствующим группам значений AUC для АФ и Се6, чтобы проверить значимость кинетических различий. При уровне значимости 5% все различия между попарно сравниваемыми группами считались статистически значимыми ( $p < 0.05$ ).

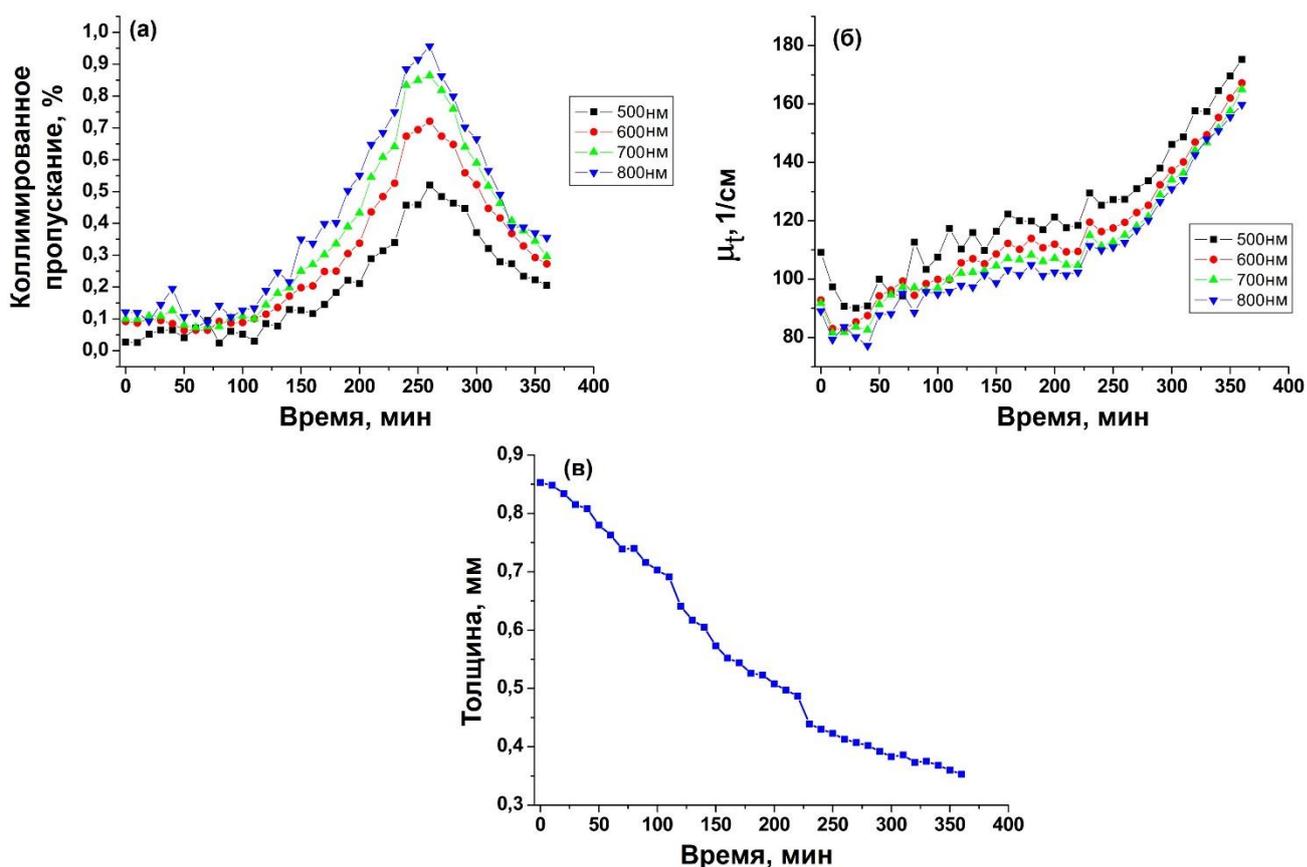
Результаты эксперимента с давлением зонда показали, что увеличение нагрузки, оказываемой спектральным зондом на кожу, привело к увеличению интенсивности флуоресценции Хлорина е6, регистрируемой через образец кожи, и к уменьшению интенсивности АФ кожи. Данные результаты согласуются с данными из литературы [258], [259], [263]–[267]. Такая тенденция объясняется авторами увеличением оптического пропускания биоткани по совокупности причин. Во-первых, устранение межтканевой жидкости из места сжатия, наблюдаемое при сжатии образцов кожи, приводит к увеличению оптической однородности кожи (согласование показателей преломления). Имеющая место быть более плотная упаковка компонентов ткани приводит в таком случае к снижению рассеяния (а следовательно, и поглощения, что сказывается на возбуждении автофлуоресценции). Также, увеличение плотности упаковки приводит к снижению общей толщины образца. Как результат, больший объем фотонов возбуждения (и испускания, соответственно) достигает слоя флуоресцентного геля (детектора, соответственно) через кожу. Это приводит к росту регистрируемой через кожу экзогенной флуоресценции. Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются экспоненциальной кривой ( $r^2 \approx 0,97$ ), давая представление о том, что интенсивность автофлуоресценции кожи и флуоресценция Хлорина е6 экспоненциально

зависят от прикладываемого давления спектрального зонда. Полученный диапазон данных можно сопоставить с эффектом давления, вызываемый спектральным зондом в экспериментах с бимодальной спектроскопией. Собственная масса зонда в этом случае оказывала давление ~100 кПа, что, как видно из Рисунка 30, вызывает снижение автофлуоресценции образцов кожи и рост экзогенной флуоресценции, регистрируемой чрескожно.

Таким образом, эффект, вызванный давлением спектрального зонда, схожий с эффектом иммерсионного просветления, был экспериментально подтверждён.

### *2.3.3. Измерения влияния дегидратации на распространение света через кожу*

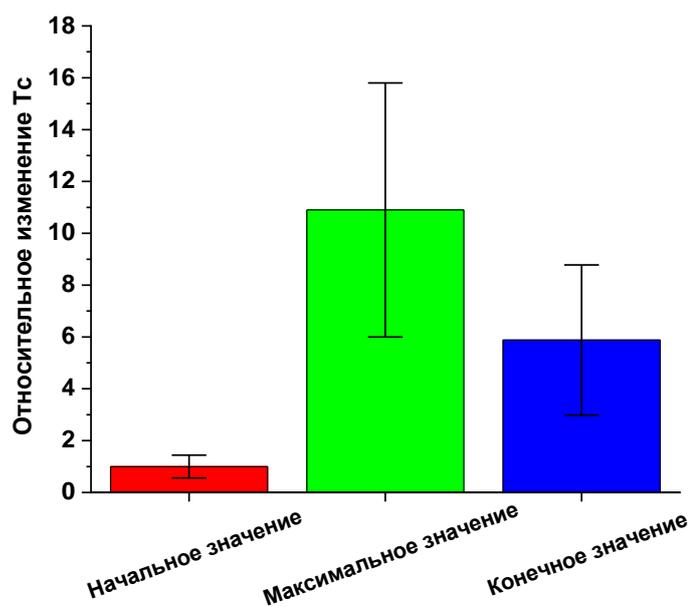
На рисунке 31 представлена типичная кинетика коллимированного пропускания одного образца кожи для нескольких длин волн, а также соответствующие кинетические кривые коэффициента ослабления света  $\mu_t$  и толщины. Коэффициент ослабления света  $\mu_t$  был рассчитан по формуле  $\mu_t = -\ln(T)/l$ , где  $T$  – пропускание, а  $l$  – толщина образца кожи. Как можно заметить, толщина образца уменьшилась более чем в 2 раза в течение полного цикла высушивания (не ограниченного 40 минутами, как в эксперименте с бимодальной спектроскопией). В процессе всего времени измерения наблюдался рост коэффициента ослабления света, в то время как коллимированное пропускание показало рост лишь до определённого момента времени. После этого на всех длинах волн наблюдался спад сигнала коллимированного пропускания. Как видно из графиков, кинетика  $\mu_t$  на первый взгляд не зависит от кинетики коллимированного пропускания, так спад пропускания не приводит к спаду ослабления света. На самом деле, основной вклад в зависимость вносит значительное изменение толщины, которая расположена в знаменателе используемой для расчёта формулы, чем и обусловлена такая кинетика  $\mu_t$ .



**Рисунок 31.** Типичная кинетика коллимированного пропускания образца кожи на нескольких длинах волн (а); соответствующие кинетики коэффициента ослабления света  $\mu_t$  (б) и толщины образца кожи (в).

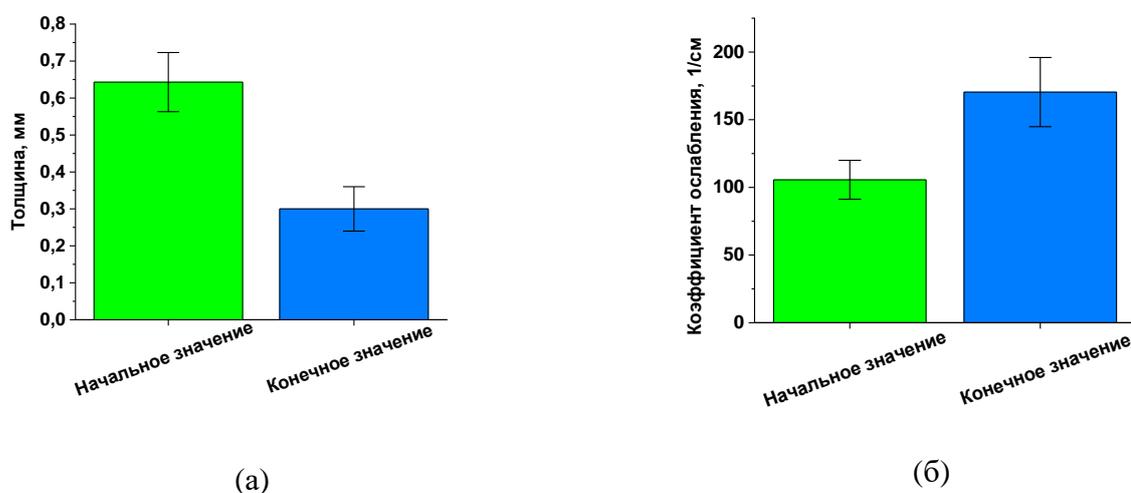
На рисунке 32 представлена гистограмма относительных изменений коллимированного пропускания всех образцов кожи в процессе дегидратации на длине волны 700 нм. При достижении образцами максимального значения коллимированного пропускания толщина кожи также значительно уменьшилась. Однако, монотонное снижение толщины образцов кожи продолжилось и после достижения максимального пропускания. Одновременно с ростом коллимированного пропускания наблюдается рост коэффициента ослабления света для всех образцов. Этот факт, вероятно, объясняется увеличением концентрации рассеивателей на единицу объема в процессе дегидратации, что приводит к росту величины  $\mu_t$ . Однако, снижение толщины образцов в данном случае привело к росту числа фотонов, прошедших через кожу. Таким образом, несмотря на рост рассеяния, кинетика коллимированного пропускания до достижения максимума по большей части определялась снижением толщины образца. Данный эффект компенсировал рост рассеяния света кожей.

Среднее снижение массы образцов по итогам эксперимента составило  $0.31 \pm 0.08$  гр., количество воды [152], испарившейся в процессе дегидратации, составило 58% от исходного объема.



**Рисунок 32.** Относительные изменения коллимированного пропускания образцов кожи в процессе дегидратации на воздухе.

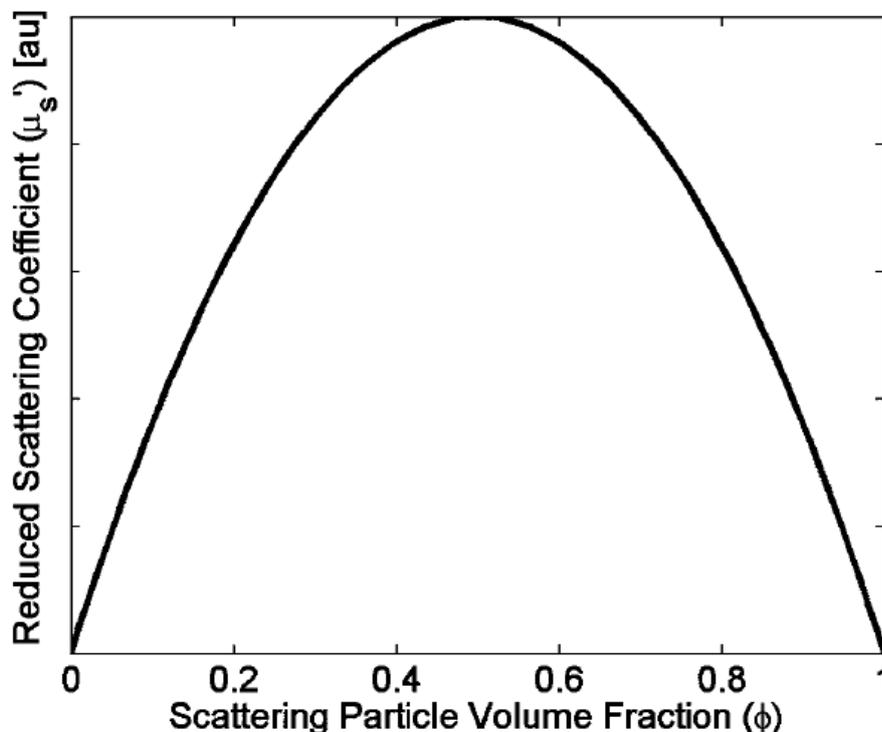
Из рисунка 32 видно, что максимальное увеличение коллимированного пропускания образцов кожи составило в среднем  $10.9 \pm 4.9$  раз, при последующем снижении изменение значения параметра относительно начального значения составило  $5.9 \pm 2.9$  раза. При этом толщина образцов постоянно уменьшалась, и в конце наблюдения снижение составило в среднем  $47 \pm 10\%$ . Коэффициент ослабления света  $\mu_t$  увеличился на  $61 \pm 18\%$  (рисунок 33).



**Рисунок 33.** Средние значения толщины образцов кожи (а) и коэффициента ослабления света в коже (б) до начала дегидратации и в конце наблюдения.

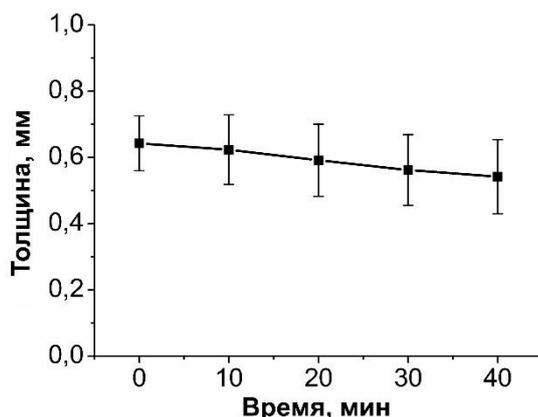
Полученные результаты по большей части согласуются с данными, представленными в литературе. В работе [268] отмечалось увеличение диффузного отражения на длинах волн 800 и 1070 нм образцов мышечной ткани быка *ex vivo* под действием температуры порядка 60°. Причиной данного эффекта, по мнению авторов, являлось увеличение шероховатости затвердевших поверхностей, что приводило к значительным ошибкам при регистрации отраженного света. Однако при измерении коллимированного пропускания данный эффект незначителен, т. к. образец находился в рамке в натянутом состоянии. Другим фактором, влияющим на рассеяние ткани, является плотность упаковки рассеивателей (пучков волокон коллагена и эластина) [269]. Как показано в работах [168], [270], уплотнение биоткани приводит к увеличению плотности упаковки рассеивателей, что может привести как к снижению, так и к повышению рассеяния, в зависимости от начальных условий (объёмная доля рассеивателей). Эвристическую модель взаимодействия света с биотканью можно представить в виде параболической зависимости приведённого коэффициента рассеивания от объёмной доли рассеивающих частиц (Рисунок 34). При высушивании увеличение фракции рассеивателей ведет к увеличению приведенного коэффициента рассеяния [268]. Однако, это не объясняет резкий спад коллимированного пропускания после достижения максимума. При взгляде на результаты эксперимента для одного образца (Рисунок 31) становится заметно, что несмотря на монотонный спад толщины кожи в процессе дегидратации, значение по шкале времени, соответствующее началу спада величины коллимированного пропускания (~250 минут), соответствует аналогичному значению, при котором изменилась крутизна роста коэффициента ослабления света (Рисунок 31 (б)). После достижения этой временной точки наклон кинетики ослабления света увеличился, что не связано с изменением толщины. Похожее поведение, но с другими временными точками, наблюдалось и для остальных образцов, что, вероятно, зависело от морфологических вариаций строения кожи разных животных. Вероятно, здесь имеет место дополнительный процесс, существенно влияющий на рассеяние кожи после достижения определённого этапа воздушной дегидратации. Этим существенным процессом, на наш взгляд, является рассогласование показателей преломления компонентов биоткани [268], [271], [272]. Большинство молекул воды в коже связано с протеинами за счёт водородной связи. «Связанная вода» подразделяется, в зависимости от водородной связи, на жёстко связанную воду (один донор, два акцептора), сильно связанную воду (два донора, два акцептора) и слабо связанную воду (один донор, один акцептор). Малая часть воды в коже находится в свободном состоянии и называется «несвязанной водой». Упомянутое выше рассогласование показателей преломления вызвано фазовым переходом сильно связанной и слабо связанной воды в несвязанную. Поскольку эти два типа воды составляют 93% от общего содержания воды в коже [273], экспериментально наблюдаемое уменьшение общего объёма воды на 58% при

дегидратации служит индикатором подобного перехода. Выход связанной воды в среду и вызывает данное рассогласование. При оптическом просветлении с помощью ОПА этот спад компенсируется замещением внутритканевой жидкости в среде оптическим просветляющим агентом.



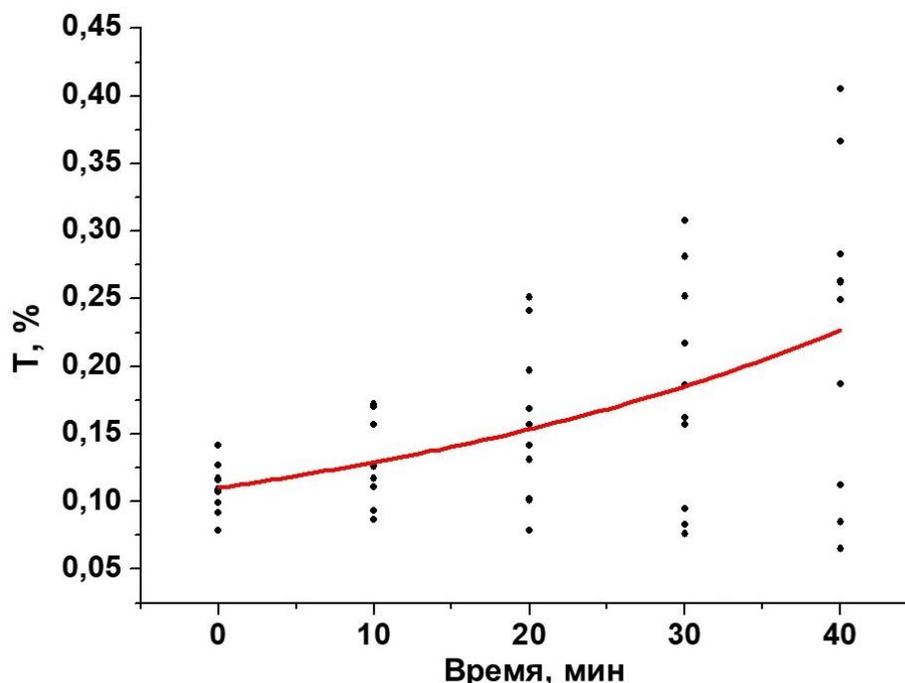
**Рисунок 34.** Параболическая взаимосвязь между объёмной долей рассеивателей кожи и приведённым коэффициентом рассеяния [271].

На начальном этапе дегидратации, однако, наблюдался рост коллимированного пропускания. Для связи этих результатов с результатами, полученными в эксперименте с бимодальной спектроскопией, из общей кинетики изменения толщины в процессе дегидратации был выбран начальный период (40 минут). На Рисунке 35 показана средняя толщина десяти ( $n=10$ ) образцов кожи крыс *ex vivo*, измеренная каждые 10 минут в течение 40 минут. После 40-минутного протокола высушивания стало возможно наблюдать 15-процентное уменьшение средней толщины кожи.



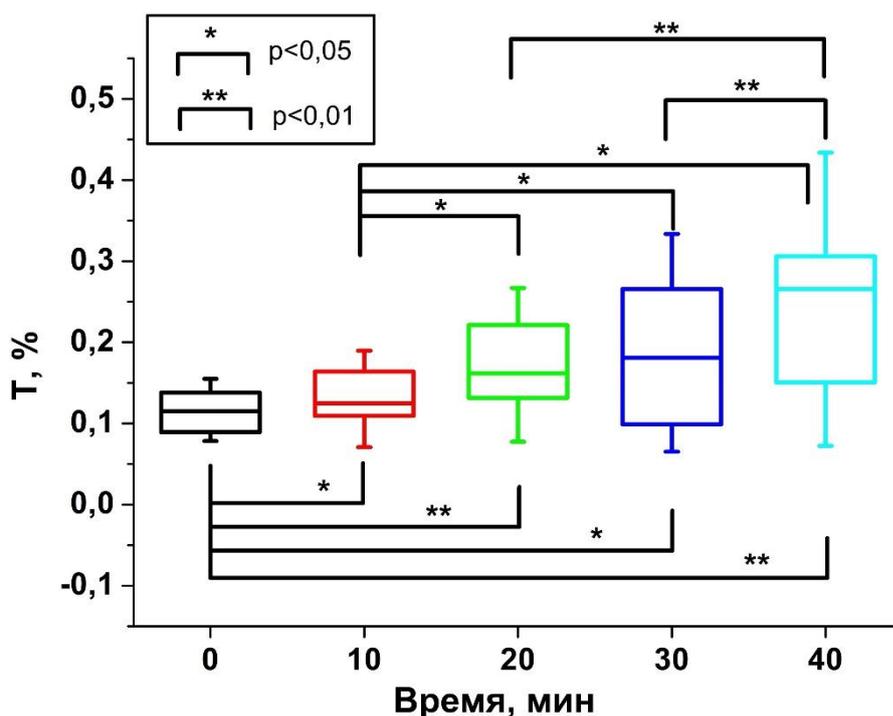
**Рисунок 35.** Средняя толщина десяти ( $n=10$ ) образцов кожи крысы *ex vivo* как функция времени высушивания.

В зависимости от конкретных образцов кожи и исходной толщины соответствующий сигнал коллимированного пропускания увеличивался до 8 раз в процессе высушивания. Иллюстративный график кинетики коллимированного пропускания, измеренный при  $\lambda = 600$  нм для 10 образцов кожи, представлен на Рисунке 36. На нём показана общая тенденция увеличения пропускания примерно в 2 раза после 40 минут высушивания (изменение значения линии тренда с 0.11 до 0.22). Для спектрального диапазона 500–750 нм наблюдалось увеличение интенсивности пропускания в процессе 40-минутного протокола высушивания.



**Рисунок 36.** Кинетические неусреднённые данные (чёрные точки) коллимированного пропускания десяти ( $n=10$  skin) образцов кожи крысы *ex vivo*, измеренные на длине волны  $\lambda=600$  нм с линией тренда, показывающей общую тенденцию роста (красная линия).

Чтобы проверить значимость наблюдаемых различий к группам средних значений коллимированного пропускания в диапазоне 500–750 нм был применен двусторонний критерий знаковых рангов Уилкоксона. Как видно из Рисунка 37, при уровне значимости 5% коллимированное пропускание, измеренное в любой момент времени, значительно отличалось от значений коллимированного пропускания, измеренного в любой другой момент времени (за исключением  $t=t_0+20$  против  $t=t_0+30$ , что является единственной парой, которая не даёт статистически значимых различий).



**Рисунок 37.** Ящичковая диаграмма кинетических групп коллимированного пропускания (средние значения в диапазоне длин волн 500–750 нм) ( $n = 10$ ) и соответствующие результаты проверки методом двустороннего критерия знаковых рангов Уилкоксона значимости различий коллимированного (скобки - попарное сравнение). Значения ящиков — первый квартиль, медиана и третий квартиль, усы — минимум и максимум данных.

Как отмечалось в Разделе 2.3.3, дегидратация со временем вызвала увеличение коллимированного пропускания через кожу. Параллельные измерения толщины показали, что наблюдаемое увеличение может быть связано с истончением кожи со временем, которое происходит из-за вытеснения и испарения воды из исследуемой области. В то же время структурные изменения кожи (большее количество рассеивателей и хромофоров на единицу объема) могут привести к увеличению коэффициентов рассеяния и поглощения, с одной стороны, но и к большей упорядоченности тканевых компонентов (волокон коллагена и эластина) с другой стороны. Последнее приводит к конструктивной интерференции волн рассеяния с лучшим общим пропусканием света через образец [30]. Вместе с истончением слоя

ткани эти два механизма, вероятно, позволяют компенсировать некоторое увеличение коэффициентов рассеяния и поглощения, что было продемонстрировано экспериментально.

Гибридная модель *ex vivo*, которая была протестирована в этом исследовании, показала хорошую применимость для метода спектроскопии, поскольку позволяет проанализировать спектральный вклад различных флуорофоров, расположенных на разных глубинах, и их кинетику. Однако в данной конфигурации накладываются и некоторые ограничения. В отличие от условий *in vivo*, в этой модели отсутствуют кровотоки и лимфоток (внутри сосудов и капилляров присутствует только остаточный гемоглобин): поэтому влияние гемоглобина на полученные спектры в целом невелико, и также наблюдается дегидратация кожи. Однако эта двухслойная модель хорошо подходит для изучения просветления с помощью спектроскопии с пространственным разрешением, поскольку разные расстояния источник-приёмник регистрации фотонов чувствительны к разным глубинам, что позволяет различать различный эффект оптического просветления на разных глубинах кожи.

Сигнал в широком спектральном диапазоне (такой, например, как оптические спектры, зарегистрированные *in vivo*), «смешивающий» вклады всех слоев кожи, не поддается такой интерпретации.

Более того, эта модель ранее использовалась [251] с флуоресцентной спектроскопией без пространственного разрешения. Мы продемонстрировали, что эта модель также подходит для изучения влияния поверхностно нанесённых ОПА на образцы кожи с течением времени с использованием спектроскопии с пространственным разрешением, а также сочетания флуоресцентной спектроскопии и диффузного отражения для исследования зависимости эффективности процесса ОП от глубины.

В гибридной модели ДМСО в качестве ОПА обеспечил большее по сравнению с сахарозой просветляющее воздействие, если учитывать увеличение интенсивности экзогенной флуоресценции гелевой подложки. Результаты, полученные с помощью ДО, показали, что процесс просветления происходил в основном за счет растворения липидного бислоя кожи – свойству, благодаря которому ДМСО давно и успешно используется в качестве усилителя проницаемости кожи для лекарственных средств.

В нашем исследовании также был поднят вопрос о методологии и, в частности, о контрольных измерениях, поэтому использовались два контрольных условия: использование физиологического раствора и использование «ничего» (ни физраствора, ни какого-либо другого типа раствора), то есть «сухое» условие.

Дегидратация проявилась как условно новый эффект, который необходимо учитывать в «сухом» условии, и которого по очевидным причинам не наблюдалось при использовании

физиологического раствора. Насколько нам известно, такой процесс в схожих экспериментальных условиях до сих пор практически не описывался в литературе [34], [35].

## 2.4. Выводы

Данное исследование было выполнено с использованием образцов кожи *ex vivo* (человека и крысы). Экспериментальные результаты, представленные в этой главе, а также сопоставление с имеющимися в литературе моделями подтверждают, что улучшение диагностического потенциала по глубине спектроскопии диффузного отражения и флуоресцентной спектроскопии с пространственным разрешением связано не только с согласованием показателей преломления при воздействии ОПА, но и с эффектом механического просветления за счет давления, оказываемого спектральным зондом. В случае отсутствия каких-либо жидкостей, нанесенных на образец кожи, наибольшее увеличение сигнала, регистрируемого от экзогенного флуорофора для всех длин волн возбуждения, было зарегистрировано на расстоянии источник-приёмник D1 ( $40 \pm 16\%$ ) и было связано также с потерей воды кожей *ex vivo*, которая не может сохранять свои физиологические свойства и истончается со временем. После оптического просветления стало возможным регистрировать увеличенную по интенсивности флуоресценцию от слоя агарозного геля гибридной модели кожа/гель. Эффект ОПА 2 (ПЭГ/ДМСО) оказался сильнее (увеличение сигнала для всех длин волн возбуждения вплоть до  $56 \pm 25\%$ , с наибольшим эффектом на расстоянии D1), чем эффект ОПА 1 (ПЭГ/ПГ/Сахароза, увеличение сигнала для всех длин волн возбуждения вплоть до  $50 \pm 12\%$ , с наибольшим эффектом на расстоянии D1), возможно, за счет воздействия ДМСО на конформацию кератина рогового слоя.

Кроме того, был продемонстрирован большой потенциал флуоресцентной спектроскопии на нескольких длинах волн возбуждения в сочетании с диффузным отражением, что позволит при переносе данного метода в клинические условия различать спектральные вклады, связанные с различными флуорофорами кожи, расположенными на разных глубинах.

Результаты, подобные эффекту оптического просветления, полученные в «сухом» состоянии, также позволили проанализировать эффект, вызванный давлением спектрального зонда, который, вызывая уплотнение слоев кожи, также поспособствовал просветлению наряду с дегидратацией и согласованием показателей преломления, вызванным ОПА.

При дегидратации кожи *ex vivo* на воздухе был зарегистрирован рост коллимированного пропускания (до  $>10$  раз). Затем, при монотонном уменьшении толщины и увеличении наклона кинетики коэффициента ослабления света в биоткани, вызванного повышением рассогласования показателей преломления компонентов биоткани, регистрировалось снижение коллимированного пропускания (до  $>4$  раз от достигнутого максимального значения).

Результаты, представленные в главе, опубликованы в следующих работах:

1. **Sergey M. Zaytsev**, Marine Amouroux, Grégoire Khairallah, Alexey N. Bashkatov, Valery V. Tuchin, Walter Blondel, Elina A. Genina, (2022) Impact of optical clearing on ex vivo human skin optical properties characterized by spatially resolved multimodal spectroscopy, *Journal of Biophotonics*, 2022, 15 (1), e202100202. <https://doi.org/10.1002/jbio.202100202>
2. Prisca Rakotomanga, Charles Soussen, Grégoire Khairallah, Marine Amouroux, **Sergey Zaytsev**, Elina Genina, Hang Chen, Alain Delconte, Christian Daul, Valery Tuchin, Walter Blondel, (2019) Source separation approach for the analysis of spatially resolved multiply excited autofluorescence spectra during optical clearing of ex vivo skin, *Biomedical optics express*, 2019, 10 (7), pp.3410-3424. DOI: 10.1364/BOE.10.003410
3. W. Blondel, **S. Zaytsev**, V. Colas, G. Khairallah, P. Rakotomanga, C. Soussen, C. Daul, M. Amouroux, E. Genina, V. Tuchin, (2020) Study of the impact of optical clearing on skin absorption, scattering and autofluorescence properties, *2020 International Conference Laser Optics (ICLO)*, St. Petersburg, Russia, pp. 1-1, DOI: 10.1109/ICLO48556.2020.9285675
4. **S. M. Zaytsev**, W. Blondel, M. Amouroux, G. Khairallah, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, E. A. Genina, (2020) Optical spectroscopy as an effective tool for skin cancer features analysis: applicability investigation, *Proc. SPIE*, Vol. 11457, P. 1145706, <https://doi.org/10.1117/12.2564201>

## **ГЛАВА 3. Экспериментальное исследование эффекта биосовместимого усиленного оптического просветления кожи человека *in vivo* методом конфокальной оптической когерентной томографии с линейным полем**

### **3.1. Введение**

В разделе 1.3.4 главы 1 было показано, что в настоящее время существует множество примеров использования технологии ОП для повышения контраста ОКТ-визуализации кожи *in vivo* [35], [43], [236], [237], [239] и, в частности, его применение для диагностики рака кожи [238]. Однако при переносе этой методики в клинические условия возникает необходимость соблюдения установленных регламентов, в том числе правил применения химических препаратов на здоровой и патологически измененной коже пациентов. При высоких концентрациях ОПА показывают значительные результаты, однако в клинических условиях может потребоваться снижение концентрации используемых веществ, чтобы пройти порог клинической применимости и биосовместимости [274].

Проникновение большинства химических веществ в кожу затруднено, так как их останавливает роговой слой, выступающий в роли естественного барьера человеческого организма [46], [275], [276]. Большинство используемых ОПА гидрофильны и используются в высоких концентрациях, что затрудняет их проникновение через роговой слой в живой эпидермис [277], и в то же время может вызывать повреждение и даже некроз кожи при введении под дерму [195], [278]. С другой стороны, низкая концентрация ОПА не позволяет добиться заметного эффекта просветления. Таким образом, применение ОПА в биосовместимых концентрациях следует сочетать с применением химических усилителей проницаемости, которые даже при относительно низких допустимых концентрациях могут создать пути проникновения через труднопроницаемую структуру рогового слоя и облегчить проникновение ОПА. Кроме того, физические методы повышения проницаемости можно комбинировать с химическими усилителями проницаемости для более эффективного биосовместимого просветления.

Учитывая это, целью нашего следующего экспериментального исследования, представленного в данной главе, была экспериментальная оценка эффективности оптического просветления кожи человека *in vivo* биосовместимыми ОПА в сочетании с химическими и физическими усилителями проницаемости. Для этого нами использован метод конфокальной ОКТ с линейным полем (LC-ОКТ).

## 3.2. Методы и материалы

### 3.2.1. Химические вещества

В этом исследовании девять различных комбинаций ОПА и химических усилителей проницаемости (энхансеров) были исследованы как потенциальные клинически биосовместимые смеси. Они были выбраны на основании литературных данных [30], [33]–[35], в частности, полиэтиленгликоль 400 (ПЭГ, Sigma-Aldrich, США) в качестве ОПА из группы спиртов и два водных 3М-раствора сахаров – сахароза (Sigma-Aldrich, США) и глюкоза (Sigma-Aldrich, США). В качестве энхансеров были выбраны [30], [34]: пропиленгликоль (ПГ, Sigma-Aldrich, США) как представитель группы спиртов, диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma-Aldrich, США) как органический растворитель и олеиновая кислота (ОК, Sigma-Aldrich, США) из группы жирных кислот. В целях соблюдения условий биосовместимости, концентрации каждого из вышеупомянутых веществ в настоящем экспериментальном исследовании не превышали их максимально допустимую концентрацию, установленную FDA и содержащуюся в базе данных неактивных ингредиентов, для поверхностного нанесения на кожу в виде раствора [274]. Полученные смеси ОПА и энхансеров, а также их объемные доли и максимально допустимые концентрации из базы данных FDA представлены в Таблице 4. Поскольку нет информации о максимально разрешенной FDA концентрации глюкозы и сахарозы для поверхностного нанесения, для целей данного эксперимента была установлена концентрация 50%, поскольку она упоминалась как наиболее эффективная концентрация глюкозы для оптического просветления в работе [279]. В случае ОК и ДМСО нельзя было смешать их только с каким-либо из трех ОПА, так как в этом случае была бы превышена максимально допустимая концентрация для этих веществ. Для этого к их смесям дополнительно были добавлены ПГ или дистиллированная вода для компенсации допустимых концентраций.

**Таблица 4.** Значения концентрации девяти смесей ОПА и энхансеров с соответствующими максимальными концентрациями, разрешенными FDA для поверхностного нанесения в виде раствора, и объемные доли (% , объём/объём) полученных смесей (w/v – весо-объемная концентрация, w/w – весовая концентрация, Max c. (FDA) – максимально разрешенная FDA концентрация).

Концентрация (%, объём/объём)	ОПА			Энхансер			Дистил. вода
	Глюкоза	ПЭГ- 400	Сахароза	ДМСО	ОК	ПГ	
Max c. (FDA)	-	4 (w/v)	-	45.5 (w/w)	7.4 (w/w)	99.98 (w/v)	-
Глюкоза/ДМСО	50			45.5			4.5
Глюкоза/ОК/ПГ	50				7.44	42.56	

Глюкоза/ПГ	50		50	
ПЭГ/ОК/ПГ	3.52		7.44	89.04
ПЭГ/ПГ	3.52			92.48
ПЭГ/ПГ/ДМСО	3.52	45.5		50.98
Сахароза/ДМСО	50	45.5		4.5
Сахароза/ОК/ПГ	50		7.44	42.56
Сахароза/ПГ	50			50

Также был использован 36 г/л водный раствор гиалуроновой кислоты (ГК, Эвалар, Россия) для обработки конкретных участков кожи с целью определения потенциального эффекта применения гиалуроновой кислоты в качестве химического усилителя проницаемости без включения в смеси ОПА. Решение не включать гиалуроновую кислоту в состав ОПА, а использовать ее отдельно было принято постольку, поскольку в литературе отмечалось повышение проницаемости кожи для гидрофильных и липофильных ОПА после предварительной обработки кожи водным раствором гиалуроновой кислоты [196].

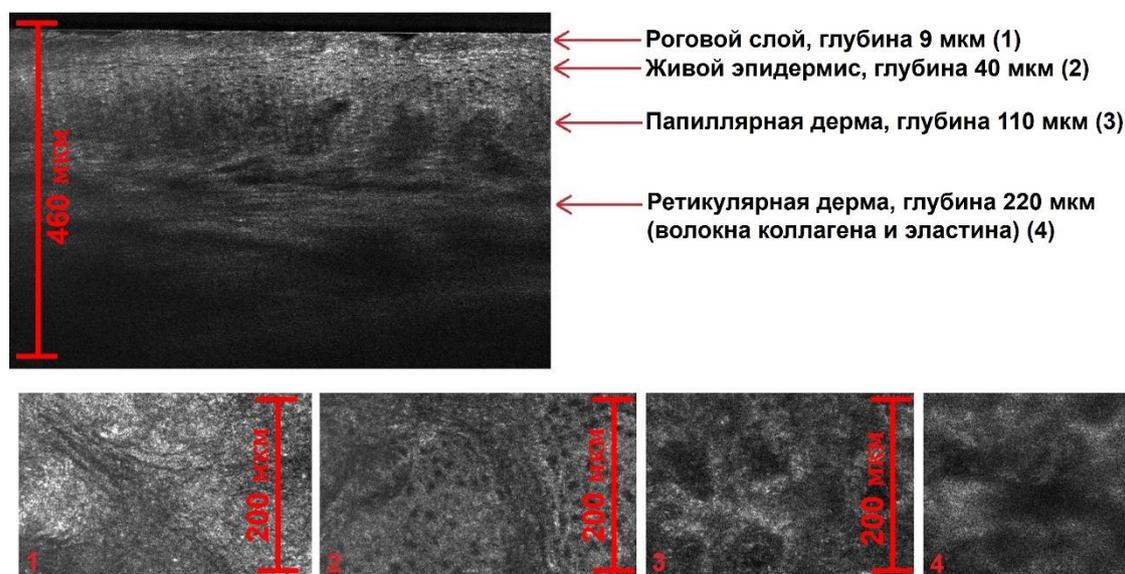
### 3.2.2. Исследуемые участки кожи

Исследуемые участки кожи человека представляли собой участки кожи тыльной поверхности левой и правой кисти *in vivo* между большим и указательным пальцами здоровых добровольцев. В исследовании приняли участие три добровольца в возрасте от 25 до 31 года с фототипом кожи 2 и 3. Из-за ограниченного количества исследуемых участков кожи, экспериментальные исследования были повторены несколько раз на каждом участке. Для предотвращения остаточных эффектов предыдущего протокола каждый участок кожи оставался без воздействий в течение недели до начала следующего воздействия. Все добровольцы дали информированное согласие на местное применение смесей ОПА, дермабразию и сонофорез кожи на тыльной стороне ладони, а также на получение изображений методом LC-ОСТ для анализа кинетики оптического просветления. Безопасность добровольцев была гарантирована благодаря использованию одобренных FDA концентраций ОПА и медицинских устройств LC-ОСТ, а также устройств для дермабразии и сонофореза с маркировкой «Европейского соответствия» (CE). Протокол исследований был утверждён комитетом по этике ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России (протокол № 11 от 07.08.2022 г.)

### 3.2.3. Экспериментальное оборудование

#### 3.2.3.1. LC-OCT

Для получения изображений был использован прибор для конфокальной оптической когерентной томографии с линейным полем (LC-OCT) «deepLive» (Damae Medical, Франция). Работая в спектральном диапазоне 650–950 нм, излучаемом суперконтинуумным лазером, он обеспечивает уникальный режим трехмерной визуализации, позволяющий переключаться с гистологического вертикального режима на конфокальный горизонтальный режим и записывать трехмерный набор (стак) тонких объемов тканей *in situ* с максимальным продольным и поперечным разрешением менее 1.3 мкм и глубиной проникновения около 500 мкм [126]. Такое разрешение позволяет оценить изменения контраста исследуемой кожи, вызванные оптическим просветлением, на клеточном уровне (Рисунок 38).



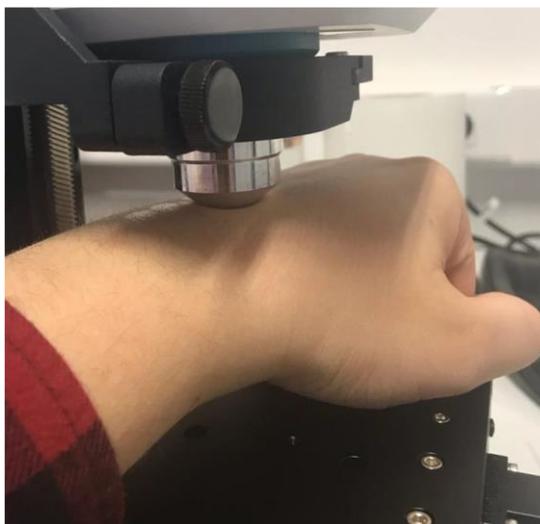
**Рисунок 38.** (вверху) «гистологический» В-скан, извлеченный из 3D-изображения, полученного с помощью LC-OCT, демонстрирующий видимое различие между различными слоями кожи; (внизу) изображения 4 различных слоев кожи, извлеченные в виде конфокальных горизонтальных сечений из 3D-изображения: роговой слой на глубине 9 мкм (1), живой эпидермис на глубине 40 мкм (2), папиллярная дерма на глубине 110 мкм (3), ретикулярная дерма на глубине 220 мкм (4).

#### 3.2.3.2. Физические усилители проницаемости

Терапевтический ультразвук (Pulson 100, Gymna, Бельгия) использовался в качестве физического усилителя проницаемости в экспериментах с ОКТ, поскольку этот метод помогает преодолеть барьерные свойства кожи [223], [224], [227]. Рабочий цикл составил 100 %, частота составляла 1 МГц, плотность мощности составила 1 Вт/см<sup>2</sup>. Вторым физическим усилителем проницаемости была микродермабразия (Philips VisaCare, Philips, Нидерланды). Эта процедура

широко используется в косметологии и предполагает абразию/удаление рогового слоя, что приводит к увеличению проницаемости кожи для ОПА.

#### *3.2.4. Экспериментальный протокол*



**Рисунок 39.** Фотография тестируемого участка кожи при мягком контакте с зондом LC-OCT.

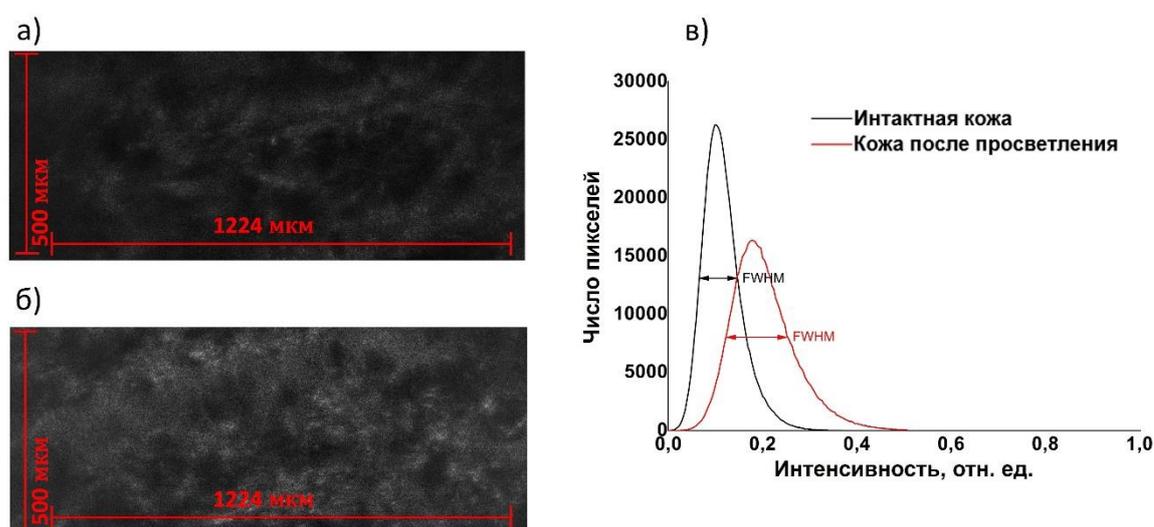
Каждый из перечисленных ОПА был использован отдельно и, для сравнения, после предварительной обработки участков кожи раствором гиалуроновой кислоты. Перед тестированием участки кожи были обработаны этанолом. Затем, с помощью LC-OCT регистрировалось трёхмерное изображение (Рисунок 39). После этого исследуемый участок подвергался дермабразии в течение 1 минуты для нарушения целостности рогового слоя для усиления проникновения ОПА. Затем, после снятия очередного 3D-изображения, выбранный участок кожи дважды по 5 минут обрабатывался ультразвуком. Для каждого ОПА у каждого добровольца было исследовано 2 участка кожи. На первом участке в течение обоих 5-минутных интервалов ультразвуковой обработки на кожу поверхностно наносился ОПА. На втором участке кожи в течение первых 5 минут ультразвуковой обработки на кожу наносился водный раствор гиалуроновой кислоты вместо ОПА. Во вторые 5 минут ультразвукового воздействия на кожу наносили выбранный ОПА, как и в случае с первым участком кожи. ОКТ-визуализация участков кожи осуществлялась между УЗ-обработками, а также в течение 30 минут с интервалом в 5 минут после ультразвукового воздействия. Для каждой ОКТ-визуализации в качестве иммерсионной жидкости для датчика LC-OCT был использован ОПА, применяемый в каждом конкретном случае. В контрольных измерениях были использованы 2 участка кожи каждого добровольца. В качестве иммерсионной жидкости использовалось парафиновое масло. На первом участке кожа не подвергалась ни одному из внешних воздействий, описанных в

протоколе для ОПА. Было зарегистрировано 10 последовательных 3D-изображений с теми же временными интервалами, как если бы к коже применялся протокол ОПА. На втором участке был выполнен стандартный протокол, описанный для ОПА, с использованием предварительной обработки гиалуроновой кислотой в первые 5 минут УЗ-воздействия. В следующие 5 минут УЗ-обработки на кожу вместо ОПА было нанесено парафиновое масло. Остальные шаги в точности повторяли описанный протокол для ОПА.

### 3.2.5. Анализ полученных данных

Из полученных 3D-изображений для анализа был использован весь объём кожи по глубине, за исключением поверхностного слоя толщиной 36 мкм. Это было сделано для того, чтобы игнорировать поверхностные области с высокой контрастностью, вызванные отражением от стеклянной поверхности интерфейса зонда LC-ОСТ, который выполнен с небольшим наклоном. Таким образом, роговой слой, чья средняя толщина составляет 20 мкм [41] в основном не был включён в анализ, а поверхность фактически анализируемого изображения представляла собой зернистый слой.

Для анализа данных было рассчитано распределение интенсивности пикселей горизонтального сечения ( $1224 \times 500$  пикселей) 3D-изображения размером  $1224 \times 500 \times 460$  мкм (Рисунок 40). Учитывая трёхмерную структуру исходного изображения, такое распределение было рассчитано для каждого горизонтального сечения вдоль глубины (по оси  $z$ ) с шагом по глубине 10 мкм.



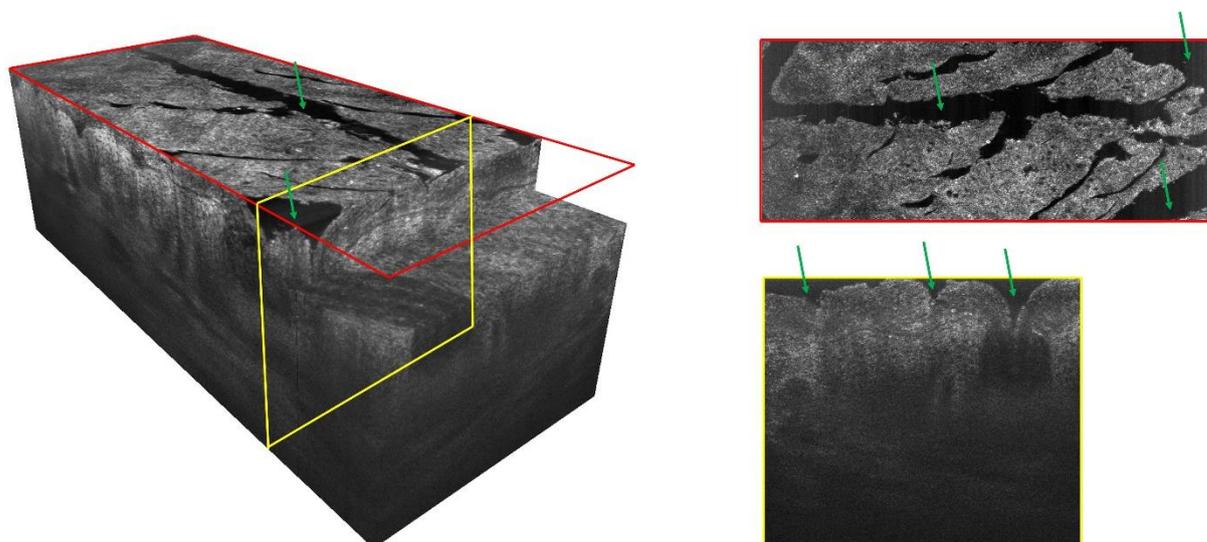
**Рисунок 40.** Примеры отдельных горизонтальных срезов, извлеченных из трёхмерных LC-ОСТ изображений на глубине 200 мкм, интактной кожи *in vivo* (а) и кожи после оптического просветления (б); (в) Соответствующие графики распределения интенсивности пикселей для интактной кожи (черный) и кожи после оптического просветления (красный) на глубине 200 мкм. Стрелки соответствующих цветов показывают полную ширину на полувысоте (FWHM) для каждой кривой.

Следует отметить, что гистограммы интенсивности пикселей, полученные для большинства отдельных горизонтальных срезов 3D-изображений, имели форму нормального распределения (Рисунок 40 (в)), за исключением поверхностных слоёв кожи, где были обнаружены вторичные пики интенсивности, связанные с полыми черными областями на изображениях, относящимися к рельефным особенностям поверхности кожи (Рисунок 41). Значение интенсивности в области пика такого распределения соответствует средней интенсивности изображения. Ширина такого распределения (стандартное отклонение) соответствует так называемой среднеквадратичной контрастности изображения (RMS contrast) [280]. Это мера разницы в яркости между светлыми и темными областями изображения. В этой главе эта величина для удобства будет именоваться контрастом. Однако, зачастую вместо стандартного отклонения для удобства определения контраста изображения используют полную ширину на полувысоте (FWHM) его гистограммы интенсивностей, соответствующую  $\sim 2.3$  стандартным отклонениям. FWHM позволяет оценить, таким образом, контраст изображения отдельного горизонтального среза.

Для одновременной оценки влияния оптического просветления на общую интенсивность и контрастность горизонтального сечения, соотношение  $R$ , связывающее среднее значение интенсивности  $I_{mean}$  и FWHM, было рассчитано как:

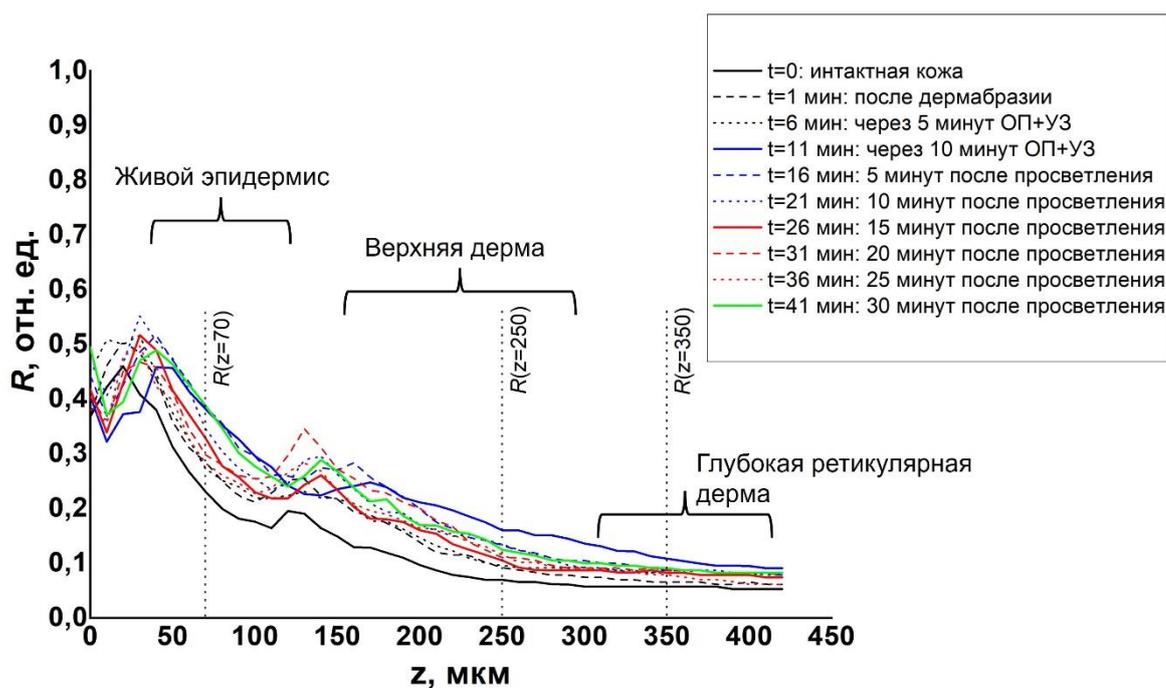
$$R = \frac{I_{mean}}{1-FWHM}, \quad (8)$$

Смысл формулы (8) заключается в том, что она позволяет с помощью единого значения определить эффект просветления на конкретный горизонтальный срез. Оптическое просветление способно повышать интенсивность ОКТ-изображений [30]. Данный параметр представлен в числителе уравнения (8). Однако, сам по себе этот параметр не даёт представления об эффекте просветления на изменение различимости структуры кожи (что отражает контраст). С этой целью, в знаменателе присутствует параметр, являющийся, как было сказано ранее, мерой оценки контраста изображения. Смысл выражения  $1-FWHM$  здесь означает то, что при ожидаемом росте контраста при просветлении значение знаменателя будет уменьшаться, что даст свой вклад в крутизну роста параметра  $R$  по мере оптического просветления кожи.



**Рисунок 41.** Иллюстрация типичного  $1224 \times 500 \times 460$  мкм трёхмерного изображения кожи (слева), полученное с помощью LC-OCT (deepLive, Damae Medical, Франция) в данном исследовании, и соответствующего горизонтального сечения поверхности (сверху справа), а также сечения по глубине (справа внизу), демонстрирующего наличие темных областей, связанных со структурой кожи (зелёные стрелки).

Для оценки способности и скорости проникновения ОПА в поверхностные и глубокие слои кожи были рассчитаны относительные изменения (в процентах) соотношения  $R$ , по сравнению с исходными значениями, для этапов экспериментального протокола  $t=6$ , 11 и 26 мин (Рисунок 42), где  $t=6$  – ОКТ-измерения через 5 минут ОП с помощью УЗ (ОП+УЗ),  $t=11$  – через 10 минут ОП+УЗ,  $t=26$  – через 15 минут после окончания просветления с УЗ-воздействием. Эти отношения были рассчитаны для значений глубины 70, 250 и 350 мкм - в середине живого эпидермиса, верхней дермы и глубокой ретикулярной дермы, соответственно. Затем эти показатели были усреднены среди добровольцев.



**Рисунок 42.** Иллюстрация динамики по глубине соотношения  $R$  на различных этапах экспериментального протокола для одного ОПА, измеренного на одном добровольце. Три вертикальные пунктирные черные линии указывают глубины в трех различных слоях кожи (показаны фигурными скобками), на которых рассчитывались изменения  $R$ .

Затем для графиков зависимости соотношения  $R$  от глубины кожи *in vivo* была рассчитана площадь области под кривой  $AUC(70-400)$  в диапазоне 70-400 мкм. Динамика этого параметра изначально подсчитана из спаренной динамики интенсивности и контраста 3D-изображения. Следовательно, на основе этого значения (имея полученные по отдельности контраст и интенсивность) возможно оценить общее изменение контраста и интенсивности 3D-изображения [30]. Диапазон от 0 до 70 мкм был исключен из расчета  $AUC$ , поскольку в верхних участках кожи наблюдались артефакты в значениях  $R$ , вызванные наличием полых областей в горизонтальных сечениях, описанных выше. Полученные значения  $AUC$  были усреднены между добровольцами по временным точкам и использованным смесям ОПА. Чтобы сравнить эффективность различных ОПА друг с другом, а также с контрольными результатами, все средние значения  $AUC$  были нормированы на соответствующие начальные значения (при  $t = 0$ ), т. е. были получены относительные значения  $AUC$ . Обработка изображений и расчеты проводились в программном обеспечении MATLAB (R2018a, The Mathworks).

### 3.2.6. Экспоненциальная аппроксимация данных $AUC$

Экспериментальный протокол, проведенный в этом исследовании, условно можно разделить по времени на две фазы. Первая фаза соответствует «активной части» протокола, в которой

выполнены все внешние манипуляции (дермабразия, УЗ-обработка) и, следовательно, основной вклад ОП, и занимает временной диапазон  $t$  от 0 до 11 минут. Остальная часть протокола включала только наблюдение и измерения в течение 30 минут (от  $t = 11$  минут до  $t = 41$  минут), таким образом, активные манипуляции здесь были уже завершены и любые изменения AUC(70-400) в основном были связаны только с пассивной диффузией ОПА в кожу. Для оценки общего завершения процесса ОП после окончания «активной» фазы (что было бы несомненным преимуществом конкретного ОПА, так как в этом случае не требовалось бы измерение в течение дополнительной «пассивной» фазы) экспериментальные данные были аппроксимированы. Принимая во внимание номинальное разделение экспериментального протокола на две фазы, описанные выше, в качестве подходящей модели была выбрана двухфазная экспоненциальная ассоциация (Biphasic Exponential Association). Она описывается функцией

$$y = \begin{cases} Y_b & x < TD_1 \\ Y_b + A_1 \left( 1 - e^{-\frac{x-TD_1}{Tau_1}} \right) & TD_1 \leq x < TD_2 \\ Y_b + A_1 \left( 1 - e^{-\frac{x-TD_1}{Tau_1}} \right) + A_2 \left( 1 - e^{-\frac{x-TD_2}{Tau_2}} \right) & x \geq TD_2 \end{cases} \quad (9)$$

где  $Y_b$  – значение  $y$  в момент начала экспоненциальной кривой,  $A_1$  и  $A_2$  – первая и вторая экспоненциальные амплитуды, соответственно,  $TD_1$  и  $TD_2$  – первый и второй временной сдвиг, соответственно,  $Tau_1$  и  $Tau_2$  – первая и вторая экспоненциальные временные константы, соответственно.

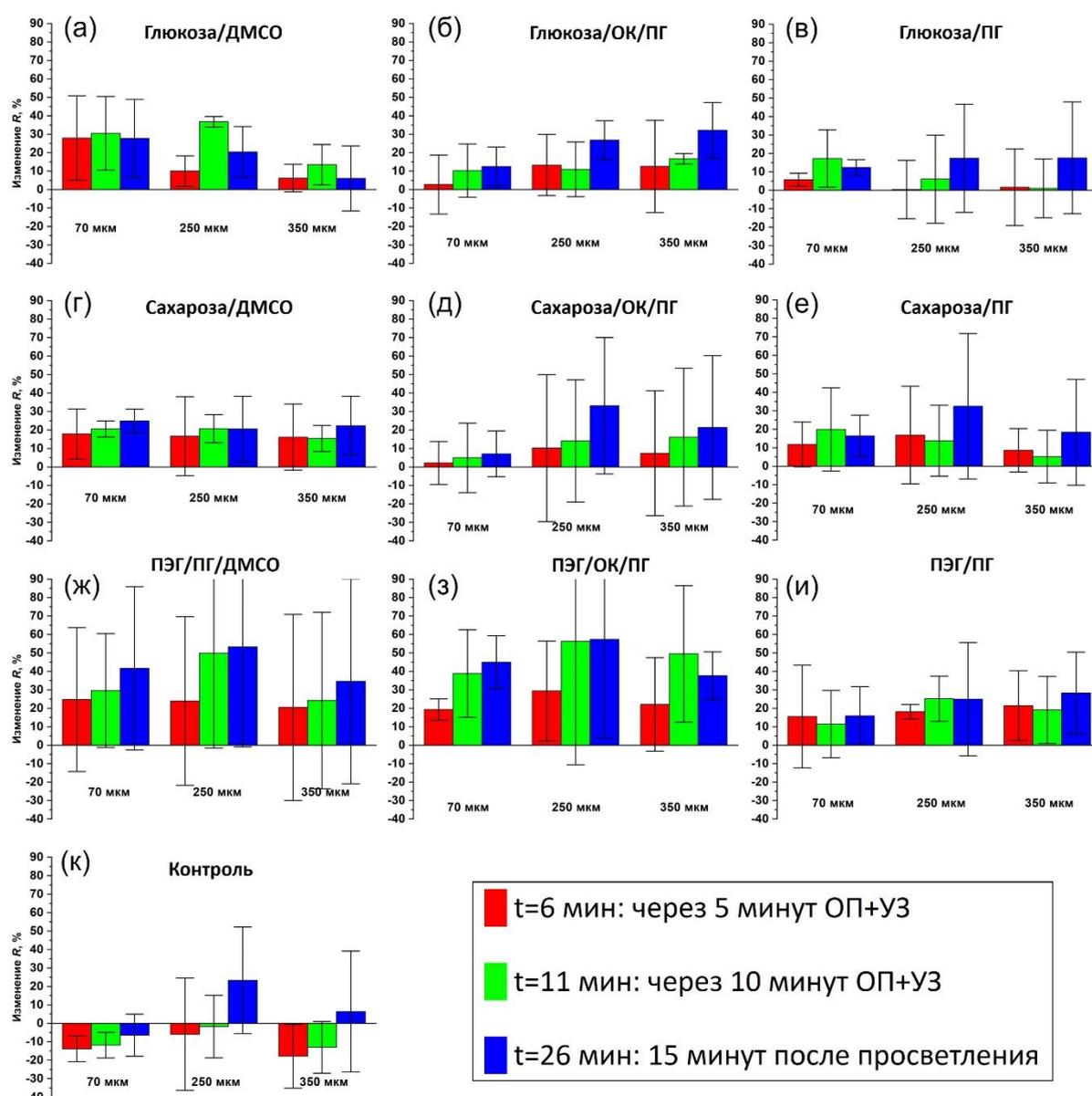
Поскольку мы исходили из гипотезы о том, что «пассивная» фаза экспериментального протокола является логическим продолжением «активной», а, следовательно, ее амплитуда должна оставаться неизменной или увеличиваться (так как недостаточно времени для существенного отката эффекта ОП за счет физиологического ответа *in vivo*), мы определили для этой модели нижнюю границу параметра  $A_2$  не ниже нуля ( $A_2 \geq 0$ ). Параметр  $Y_b$  был зафиксирован равным 1 для нашей модели, так как аппроксимируемые данные AUC(70-400) были нормированы на начальные значения для всех ОПА. Параметры  $TD_1$  и  $TD_2$  были вручную зафиксированы на значениях 0 мин и 11 мин соответственно, поскольку «активная» фаза начинается в момент времени  $t=0$ , а «пассивная» фаза сразу после выполнения всех манипуляций ( $t=11$  мин). Аппроксимация была выполнена в программном обеспечении Origin 2018 (OriginLab Corporation).

Чтобы одновременно сравнить амплитуду и временную константу аппроксимированных кинетических данных AUC(70-400), для каждого набора данных были рассчитаны два отношения. Первое представляет собой наклон аппроксимированной кривой на первой фазе

(Slope at Origin -  $SAO_1$ ), определяемое как  $SAO_1=A_1/Tau_1$ . Для второй, “пассивной” экспоненциальной кривой отношение  $SAO_2$  было рассчитано как  $SAO_2=A_2/Tau_2$ .

### 3.3. Результаты и обсуждение

Усреднённые относительные изменения  $R$  кожи на 3 различных глубинах для каждого экспериментального условия (каждого ОПА) и контрольных измерений представлены на Рисунке 43. «Усы» на столбцах гистограммы представляют собой стандартное отклонение, имеющее место из-за биологических вариаций образцов кожи *in vivo*, а также из-за того, что отдельные горизонтальные срезы использовались без усреднения по объёму кожи.



**Рисунок 43.** Относительные изменения  $R$  (относительно начального значения при  $t=0$ ): через 5 минут оптического просветления (ОП)+УЗ (красные столбцы), через 10 минут ОП+УЗ (зелёные столбцы) и через 15 минут после окончания ОП, усиленного УЗ (синие столбцы). Средние значения по всем волонтерам с соответствующими стандартными отклонениями представлены для 9 различных ОПА: (а) Глюкоза/ДМСО, (б) Глюкоза/ОК/ПГ, (в)

Глюкоза/ПГ, (г) Sucrose/DMSO, (д) Сахароза/ОК/ПГ, (е) Сахароза/ПГ, (ж) ПЭГ/ПГ/ДМСО, (з) ПЭГ/ОК/ПГ, (и) ПЭГ/ПГ и для (к) контрольного (1<sup>й</sup> участок кожи) протокола измерений.

Из Рисунка 43 видно, что контрольные измерения (Рис. 43(к)), как и ожидалось, не вызвали значительного увеличения  $R$  вне зависимости от исследуемой глубины: среднее изменение  $R$  в момент времени  $t=11$  минут составило -9%. Данные разбросы значений в контрольных измерениях (нестабильность) вызваны усреднением по 3 образцам человеческой кожи пациентов, отличавшимся как внутри одного пациента (морфологические вариации), так и между образцами (пол, возраст, различные особенности строения кожи). Использование ДМСО (Рис. 43(а,г и ж) в качестве энансера вызвало увеличение  $R$  на глубине 70 мкм (средний рост составил 27% в момент времени  $t=11$  минут). Для смесей ДМСО с обоими растворами сахаров наблюдался рост  $R$  после первых 5 минут просветления, усиленного ультразвуком (на 28% and 18% для смесей Глюкоза/ДМСО и Сахароза/ДМСО, соответственно), а затем отсутствие значительных изменений в последующие моменты времени (для смеси Глюкоза/ДМСО не было замечено изменений в  $R$  через 15 минут после окончания просветления, усиленного УЗ, для смеси Сахароза/ДМСО возможно было наблюдать 7%-рост). Тем не менее, использование ПЭГ в комбинации с ДМСО и ПГ (в качестве дополнительного энансера) вызвало 25%-увеличение  $R$  через 5 минут просветления, и через 15 минут после окончания УЗ-воздействия всё ещё было возможно наблюдать рост  $R$  на 17% (вплоть до общего увеличения до 42%). Схожая тенденция наблюдалась в глубоких слоях кожи. На глубинах 250 и 350 мкм смесь ПЭГ/ПГ/ДМСО вызывала увеличение  $R$  на 24% и 20%, соответственно, после 5 минут УЗ-просветления. Затем, через 15 минут после окончания УЗ-обработки,  $R$  также выросло до значений в 53% и 35%, соответственно. Смесь Сахароза/ДМСО также вызвала эффект просветления, выраженный в увеличении соотношения  $R$ , но в меньших масштабах и без последующего увеличения во времени. Стоит отметить, что смесь Глюкоза/ДМСО показала очень плавный рост величины  $R$  на глубине 350 мкм, в то время как на глубине 250 мкм значение  $R$  значительно возросло (на 27%) после второго 5-минутного УЗ-воздействия по сравнению с первым интервалом просветления. Это позволяет сделать вывод, что динамика проникновения смеси Глюкоза/ДМСО в глубокие слои *in vivo* кожи медленнее, чем у смеси ПЭГ/ПГ/ДМСО.

Это интересное наблюдение, так как объемная концентрация обоих сахаров в качестве ОПА-компонентов была в несколько раз выше, чем у ПЭГ. ДМСО в качестве химического усилителя проницаемости может взаимодействовать с липидами рогового слоя кожи и, таким образом, облегчать проникновение гидрофильных ОПА, таких как сахара и ПЭГ [30], [34], [262]. Вероятно, в данном случае влияние ДМСО на усиление проницаемости *in vivo* было ограниченным, что не позволило наблюдать сильный и длительный по времени эффект

просветления. ПГ, используемый в смеси ПЭГ/ПГ/ДМСО, также способен взаимодействовать с липидами рогового слоя и растворять их, ускоряя процесс дегидратации кожи под действием гиперосмотических агентов и увеличивая скорость просветления [35], [261]. Вероятно, сочетание этих двух энхансеров позволило получить усиленный эффект просветления по глубине, сохраняющийся с течением времени, даже при использовании более низких концентраций гиперосмотического ОПА-компонента. Более того, ПГ и ДМСО нельзя строго отнести к категории химических усилителей проницаемости, так как они также обладают свойствами ОПА [34], [35].

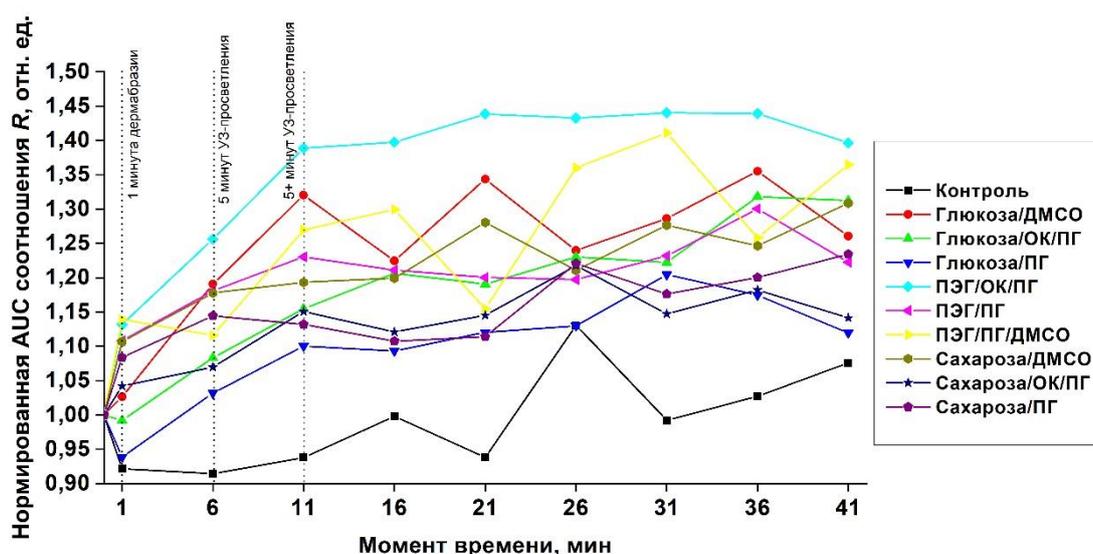
При использовании ПГ в качестве энхансера эффект просветления смесями с глюкозой и сахарозой был в основном ограничен верхними слоями кожи и не сильно увеличивался со временем (на глубине 70 мкм изменения в  $R$  через 15 минут после окончания УЗ-воздействия по сравнению с первыми 5 минутами оптического просветления составили 6% и 4% для смесей Глюкоза/ПГ и Сахароза/ПГ, соответственно). По сравнению со смесями сахаров, смесь ПЭГ/ПГ показала заметный просветляющий эффект даже в глубоком слое ретикулярной дермы. На глубине 350 мкм, значение  $R$  увеличилось на 21% через 5 минут просветления, усиленного ультразвуком, и затем, через 15 минут после окончания просветляющего УЗ-воздействия, оно продолжило плавно увеличиваться вплоть до значения в 28%. По сравнению с результатами, продемонстрированными смесью ПЭГ/ПГ/ДМСО, описанными выше, смесь ПЭГ/ПГ также продемонстрировала потенциал просветления глубоких слоёв кожи *in vivo*, хотя и в меньшем масштабе. Вероятно, это связано с отсутствием ДМСО в составе раствора [262], хотя ПГ в данном случае был использован в гораздо большей (92% объём/объём) концентрации.

Смеси сахаров с парой ОК/ПГ, используемой в качестве энхансера, продемонстрировали лучший эффект просветления по глубине, чем другие энхансеры (в смеси с ДМСО). Несмотря на то, что изменение  $R$  в эпидермальном слое на глубине 70 мкм было не таким значительным, как изменение, полученное с другими смесями сахар/энхансер, на глубине 250 мкм смеси Глюкоза/ОК/ПГ и Сахароза/ОК/ПГ показали устойчивый рост в ходе эксперимента. Для смеси Глюкоза/ОК/ПГ это соотношение увеличилось на 15% через 15 минут после окончания просветления по сравнению с этим значением через 5 минут после УЗ-воздействия. Аналогичное увеличение наблюдалось для смеси Сахароза/ОК/ПГ со значением 22%. Причем эта тенденция была обнаружена и в глубоких слоях дермы. На глубине 350 мкм относительное изменение соотношения  $R$  для смеси Глюкоза/ОК/ПГ увеличилось почти в 2.5 раза с 13% после 5 минут ОП+УЗ до 32% через 15 минут после окончания просветления (или через 25 минут после начала просветления). Те же значения для смеси Сахароза/ОК/ПГ показали 3-кратное увеличение с 7% до 21%. Это отличие от результатов, полученных без использования олеиновой кислоты (ОК) в качестве энхансера, указывает на преимущество её использования с

сахарами для просветления «глубоких» слоев кожи *in vivo*. ОК так же, как ДМСО и ПГ, может повышать проницаемость рогового слоя для ОПА за счет нарушения организации его липидного слоя [39], [178], [232]. Однако ОК не обладает гиперосмотическими свойствами и поэтому не вызывает сильной дегидратации кожи, в отличие от других энхансеров. Этот факт, а также, вероятно, большее увеличение проницаемости рогового слоя, привело к более глубокому проникновению ОПА в кожу и, как следствие, сравнительно большему увеличению контраста и интенсивности изображений по всей глубине.

На основании результатов, представленных на рисунке 43, наилучший эффект по глубине оптического просветления кожи *in vivo* был достигнут при использовании смеси ПЭГ/ОК/ПГ. В эпидермальном слое на глубине 70 мкм относительное изменение соотношения  $R$  через 15 мин после окончания УЗ-просветления по сравнению с моментом времени через 5 мин после ОП+УЗ составило 26% (с 19% до 45%). Это максимальное значение изменения  $R$ , достигнутое на этой глубине при наблюдаемых параметрах. В то же время в слоях дермы на глубине 250 и 350 мкм изменение  $R$  достигло максимального значения уже после 10-минутного просветления с помощью УЗ и составило 56% и 50% соответственно.

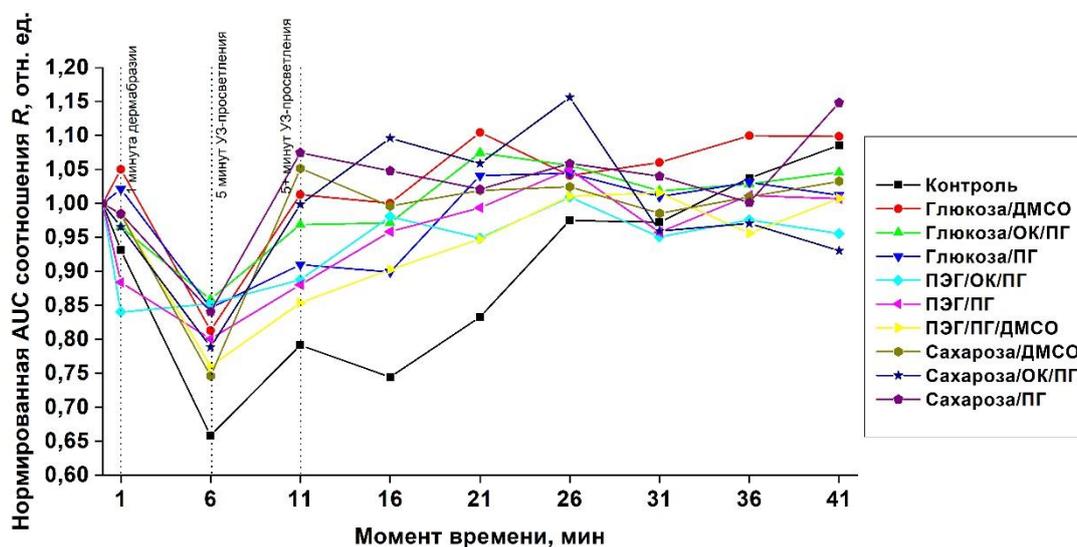
Усредненные (по всем волонтерам) кинетические кривые AUC отношения  $R(70-400$  мкм), нормированные на соответствующие исходные значения для каждого протокола оптического просветления и контрольного протокола, представлены на Рисунке 44. Кривые, представленные на данном графике, демонстрируют общее (по всей исследуемой глубине), изменение контраста и интенсивности ОКТ-изображения в процессе просветления. Столбики стандартного отклонения были удалены, чтобы кривые были легко различимыми: среднее значение стандартного отклонения составило 10 % от ненормированных начальных значений.



**Рисунок 44.** Нормированная усреднённая ( $n=3$ ) кинетика изменений AUC соотношения  $R$  для 9 различных смесей ОПА и контрольного (1<sup>й</sup> участок кожи) протокола.

Эти результаты подтверждают выводы из рисунка 43. Смесь ПЭГ/ОА/ПГ продемонстрировала наиболее уверенный рост и достигла значения AUC  $\sim 1.4$  (что соответствует увеличению на 40 %) уже в конце 10-минутного УЗ-просветляющего воздействия. Затем изменения были незначительными, что свидетельствует о завершении процесса просветления. Смесь Глюкоза/ДМСО показала схожее значение в тот же момент времени ( $\sim 1.32$ ), но, как следует из результатов, представленных на рисунке 43, эффект просветления в более глубоких слоях кожи был менее выражен по сравнению с ПЭГ/ОА/ПГ. Эти результаты хорошо согласуются с результатами модельных исследований глубины зондирования и увеличения контраста конфокальной микроскопии под действием ОПА [281]–[283] и результатами исследования [223], где комбинированное использование микродермабразии, ультразвукового воздействия и олеиновой кислоты в качестве ОПА на коже человека *in vivo* привело к более чем двукратному увеличению глубины зондирования и более чем трехкратному увеличению амплитуды сигнала ОКТ.

На Рисунке 45 показаны усредненные (по всем волонтерам) кинетические кривые AUC отношения  $R(70-400 \text{ мкм})$ , но для участков кожи, подвергнутых предварительной обработке ГК с последующим протоколом ОП (описанным в разделе 3.2.4.), нормированные на соответствующие исходные значения для каждого протокола оптического просветления и контрольного протокола (выполненного на 2-м участке кожи).

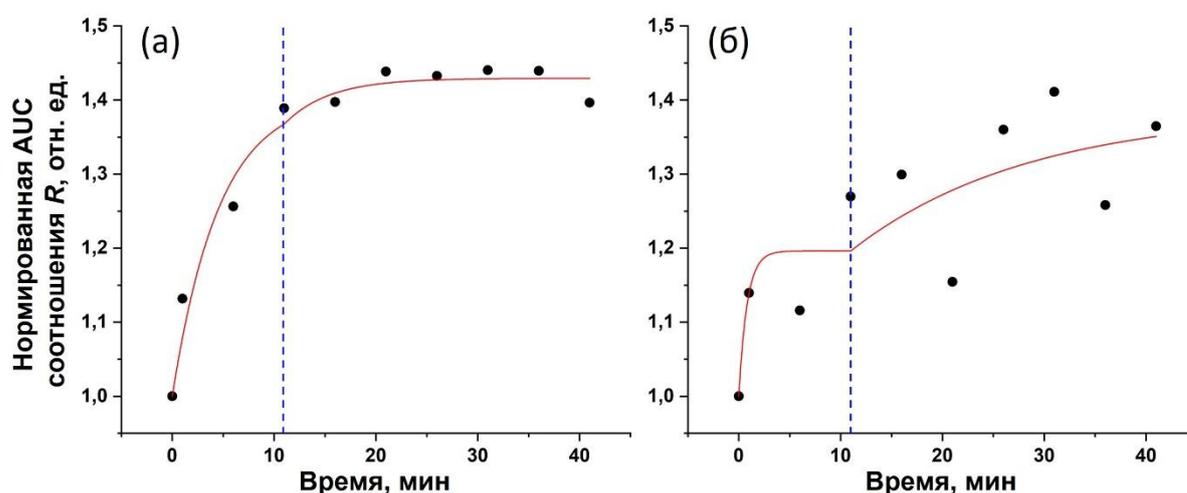


**Рисунок 45.** Нормированная усреднённая ( $n=3$ ) кинетика изменений AUC соотношения  $R$  протокола ОП с предварительной обработкой участков кожи раствором ГК, для 9 различных смесей ОПА и контрольного (2<sup>й</sup> участок кожи) протокола.

На рисунке 45 видно, что предварительная обработка экспериментальных участков гиалуроновой кислотой в течение 5 минут привела к значительному снижению AUC ( $t=6 \text{ мин}$ ), которая за счет последующих манипуляций смогла лишь вернуться к значениям, близким к

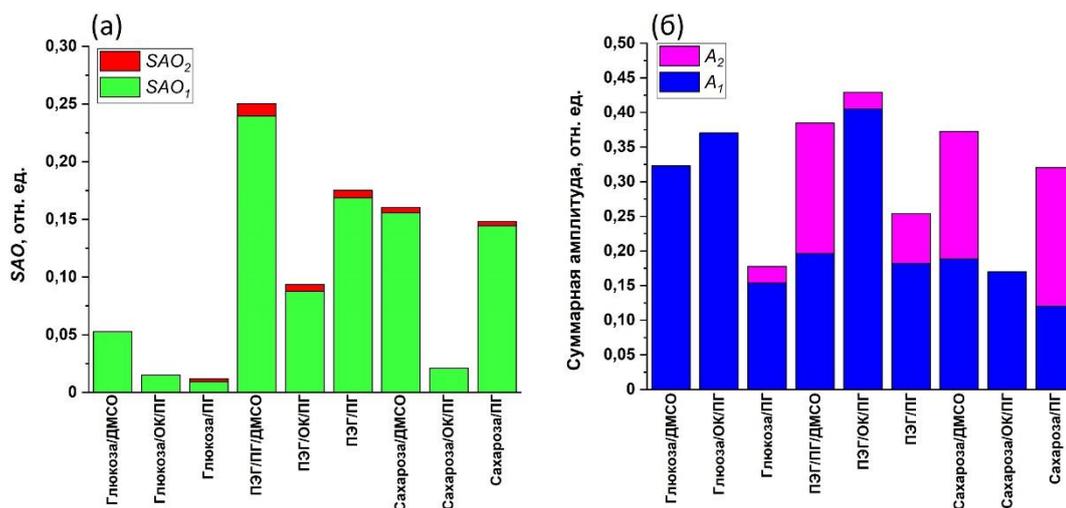
исходным. Эти результаты, по-видимому, связаны с превышением оптимальной концентрации гиалуроновой кислоты, что привело к экранирующему эффекту. Таким образом, эти результаты нельзя назвать значимыми с точки зрения анализа изменений интенсивности и контраста ОКТ-изображений. Дальнейшие исследования должны быть направлены на определение оптимальной концентрации раствора ГК, используемого для предварительной обработки кожи перед оптическим просветлением. Однако в данной работе более детальный анализ результатов, полученных на участках кожи с предварительной обработкой раствором ГК, не проводился.

Кинетика AUC(70-400) соотношения  $R$  (полученная из результатов протокола оптического просветления), аппроксимированная моделью двухфазной экспоненциальной ассоциации (описана в разделе 3.2.6.), показала высокое значение коэффициента детерминации  $r^2$ . В зависимости от использованного ОПА,  $r^2$  принял значения в диапазоне от 0.69 до 0.97 (Рисунок 46).



**Рисунок 46.** Экспериментальные данные (чёрные точки) временной кинетики AUC(70-400) соотношения  $R$  и соответствующие аппроксимирующие кривые (красные линии) двухфазной экспоненциальной модели для смеси (а) ПЭГ/ОК/ПГ, которая продемонстрировала наибольшее значение коэффициента детерминации  $r^2$  (0.97) и для смеси (б) ПЭГ/ПГ/ДМСО, которая продемонстрировала наименьшее значение  $r^2$  (0.69). Синие пунктирные линии отображают границу по времени между окончанием активной фазы и пассивной фазы просветления.

Результаты анализа параметров, извлечённых из двухфазной экспоненциальной модели, представлены на Рисунке 47.



**Рисунок 47.** Гистограммы с накоплением (а) подсчитанных параметров  $SAO_1$  и  $SAO_2$ ; извлечённых (б) параметров  $A_1$  и  $A_2$  аппроксимирующих кривых модели двухфазной экспоненциальной ассоциации.

Эти результаты в значительной степени согласуются с результатами, представленными на рисунках 43 и 44. Смесь ПЭГ/ПГ/ДМСО показывает самое высокое суммарное значение параметра  $SAO$ ; причем основной вклад в столбец вносит  $SAO_1$ , что свидетельствует о наибольшей эффективности этого ОПА в течение «активной» фазы двухфазной экспоненциальной модели с точки зрения баланса между достигнутой амплитудой и временем, затраченным на это. Аналогичные результаты были получены при использовании смесей ПЭГ/ПГ, Сахароза/ДМСО и Сахароза/ПГ. Однако при взгляде на гистограммы с накоплением суммарной амплитуды экспоненциальных кривых становится заметным, что для указанных ОПА существенный вклад в амплитуду вносит параметр  $A_2$ , соответствующий амплитуде «пассивной» фазы. Таким образом, их относительно небольшие значения  $SAO_2$  и соответствующие им значительные значения  $A_2$  указывают на длительную «пассивную» фазу перед тем, как ОП достигнет своего конечного плато эффекта, что не является оптимальным ожидаемым результатом.

Напротив, смеси Глюкоза/ДМСО, Глюкоза/ОК/ПГ и ПЭГ/ОК/ПГ показали самые высокие значения суммарной амплитуды, причем основной вклад в амплитуду внёс параметр  $A_1$ , что свидетельствует об их эффективности в плане продолжительности процесса - ОП большей частью завершилось в течение 11 минут «активной» фазы, когда были выполнены все манипуляции, описанные в протоколе эксперимента. Сравнение экспериментальных результатов кинетики значений  $AUC(70-400)$  соотношения  $R$  и амплитуд экспоненциальных кривых гипотетической двухфазной модели ясно показывает, что смесь ПЭГ/ОК/ПГ даёт наилучшие значения увеличения контраста и интенсивности сигнала, полученного методом LC-ОСТ, с точки зрения затраченного на это времени.

Таким образом, была экспериментально показана возможность оптического просветления кожи человека *in vivo* биосовместимыми ОПА в допустимых для клинического использования концентрациях в сочетании с химическими и физическими методами усиления проницаемости, что позволяет безопасно использовать данную методику для диагностики и лечения здоровых и патологически измененных участков кожи.

### 3.4. Выводы

Были представлены результаты сравнительного исследования эффекта оптического просветления биосовместимыми смесями ОПА и химических усилителей проницаемости. В качестве ОПА были использованы полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ), а также водные растворы глюкозы и сахарозы. В качестве химических усилителей проницаемости были использованы пропиленгликоль (ПГ), олеиновая кислота (ОК) и диметилсульфоксид (ДМСО). Для интенсификации эффекта оптического просветления были использованы методы физического усиления проницаемости рогового слоя, такие как дермабразия и сонофорез. Путем анализа соотношения  $R$ , которое содержит информацию о средней интенсивности и контрасте изображений, полученных методом LC-OCT, была определена эффективность по глубине оптического просветления кожи *in vivo* различными ОПА. Результаты показали, что общий уровень соотношения  $R$  на участке глубины кожи 70-400 мкм, рассчитанный как площадь под кривой (AUC), продемонстрировал наилучшее увеличение (40%) после 10 минут просветления с помощью УЗ при использовании смеси ПЭГ/ОК/ПГ. Остальные восемь смесей ОПА также показали увеличение общего уровня  $R$  по глубине. Результаты аппроксимации экспериментальных данных гипотетической моделью двухфазной экспоненциальной ассоциации хорошо согласуются с экспериментальными результатами. Таким образом, эффективность ОП биосовместимыми концентрациями смесей ОПА была доказана через наблюдаемое при их использовании увеличение общей интенсивности и контраста ОКТ-изображений по всей глубине исследуемых участков кожи *in vivo*.

Результаты, представленные в главе, частично опубликованы в следующих работах:

1. S. Tran, S. Zaytsev, V. Charykova, M. Yusupova, A. Bashkatov, E. Genina, V. Tuchin, W. Blondel, M. Amouroux, (2020) Analysis of image features for the characterization of skin optical clearing kinetics performed on *in vivo* and *ex vivo* human skin using Linefield-Confocal Optical Coherence Tomography (LC-OCT), *Proc. SPIE*, Vol. 11553, p. 115532P, <https://doi.org/10.1117/12.2575173>

## **ГЛАВА 4. Экспериментальное исследование эффекта биосовместимого усиленного оптического просветления меланомы мыши *in vivo* и *ex vivo* методом спектроскопии диффузного отражения**

### **4.1. Введение**

Меланома является самым опасным видом рака кожи, отличающимся своей инфильтративностью и высоким числом летальных исходов. Из-за сильной пигментации тканей меланомы её диагностика оптическими методами визуализации и спектроскопии в основном ограничивается поверхностной областью кожи. В итоге контраст визуализации, глубина зондирования и чувствительность данных методов при клиническом исследовании меланомы не позволяют в полной мере исследовать структуру и васкуляризацию патологической области, что напрямую связано с эффективностью последующего лечения [30].

Как было показано в разделе 1.3.4 главы 1, методика оптического просветления позволяет значительно улучшить диагностический потенциал метода спектроскопии диффузного отражения. В работах [162], [175], [186], [238], [240]–[243] было продемонстрировано, что применение ОПА приводит к снижению общего уровня сигнала диффузного отражения, что повышает чувствительность регистрируемого сигнала от пиков поглощения гемоглобина, позволяя оценить степень васкуляризации меланомы. Однако, анализ научной литературы позволяет сделать вывод, что оптическое просветление меланомы в проводимых исследованиях осуществлялось без соблюдения биосовместимых концентраций ОПА, что является необходимым критерием при переносе данного подхода в реальные клинические условия.

Таким образом, целью исследования, представленного в данной главе, была экспериментальная оценка с помощью метода спектроскопии диффузного отражения эффективности оптического просветления меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo* биосовместимыми ОПА в сочетании с химическими и физическими усилителями проницаемости.

### **4.2. Методы и материалы**

#### *4.2.1. Химические вещества*

В данном исследовании были использованы восемь различных комбинаций химических усилителей проницаемости и ОПА. Их выбор основан на имеющихся литературных данных [30], [33]–[35], а также на результатах собственных исследований, в том числе, представленных в главе 3 данной диссертации. В качестве ОПА-компонентов смесей были использованы 3 вещества: полиэтиленгликоль 400 (ПЭГ, Sigma-Aldrich, США) и два водных 3М-раствора сахаров – сахароза (Sigma-Aldrich, США) и глюкоза (Sigma-Aldrich, США). В качестве

энхансеров были использованы пропиленгликоль (ПГ, Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma-Aldrich, США) и олеиновая кислота (ОК, Sigma-Aldrich, США). Для того, чтобы используемые смеси ОПА и энхансеров отвечали требованиям клинической биосовместимости, концентрации каждого из компонентов в данном исследовании не превышали максимально допустимые, установленные FDA для поверхностного нанесения на кожу в виде раствора [274]. Список использованных в данном исследовании смесей, а также их объемные доли и максимально допустимые концентрации из базы данных FDA представлены в Таблице 4 Главы 3 (без учёта смеси Сахароза/ДМСО, не представленной в текущей главе). Показатель преломления был измерен на длине волны 589 нм с помощью рефрактометра Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония).

#### *4.2.2. Исследуемые участки кожи с модельной меланомой*

В данном исследовании были использованы девять белых беспородных мышей массой 30–34 г. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях (12-часовой период освещения, комнатная температура 18–22 °С, влажность 50-70%) вивария ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации. Индуцирование модельной меланомы кожи осуществлялось путём подкожной инъекции взвеси опухолевых клеток меланомы линии B16F10 (концентрация опухолевых клеток составляла 500 тысяч клеток на 100 мкл физраствора) в область внешней стороны бедра с двух сторон. Область локализации опухолей располагалась под слоем дермы. Культура опухолевых клеток была предоставлена лабораторией биомедицинской фотоакустики СГУ им. Н. Г. Чернышевского. Процедура подкожной инъекции взвеси опухолевых клеток была произведена сотрудником биологического факультета СГУ им. Н. Г. Чернышевского. Исследования меланомы мышей *in vivo* и *ex vivo* были одобрены этической комиссией Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского (протокол №11 от 7 июня 2022 г.).

#### *4.2.3. Экспериментальное оборудование*

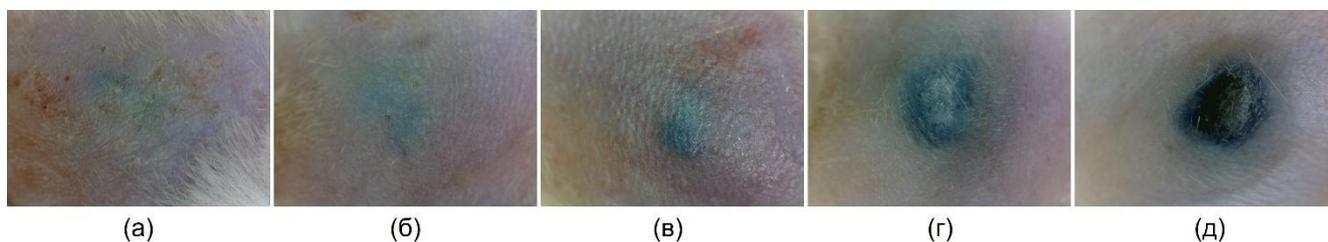
##### 4.2.3.1. Спектроскопия диффузного отражения

Для регистрации спектров диффузного отражения использовался волоконный зонд, соединённый с оптическим многоканальным спектрометром видимого и ближнего ИК диапазона USB4000-Vis-NIR (OceanOptics, США). В качестве источника света использовалась галогенная лампа HL-2000 (Ocean Optics, США).

#### 4.2.3.2. Физические усилители проницаемости

Терапевтическое устройство для сонофореза Dinatron 125 (Dinatronics, США) было использовано для физического усиления проницаемости рогового слоя кожи для ОПА, поскольку сонофорез помогает преодолеть барьерные свойства кожи [223], [224], [227]. Рабочий цикл составил 100 %, частота составляла 1 МГц, плотность мощности составила 1 Вт/см<sup>2</sup>. Вторым физическим усилителем проницаемости была микродермабразия, осуществляемая с помощью косметического устройства MD-3A 933 (Gezatone, Франция). Дермабразия позволяет увеличить проницаемость кожи для ОПА путём повреждения/удаления рогового слоя.

#### 4.2.4. Экспериментальный протокол

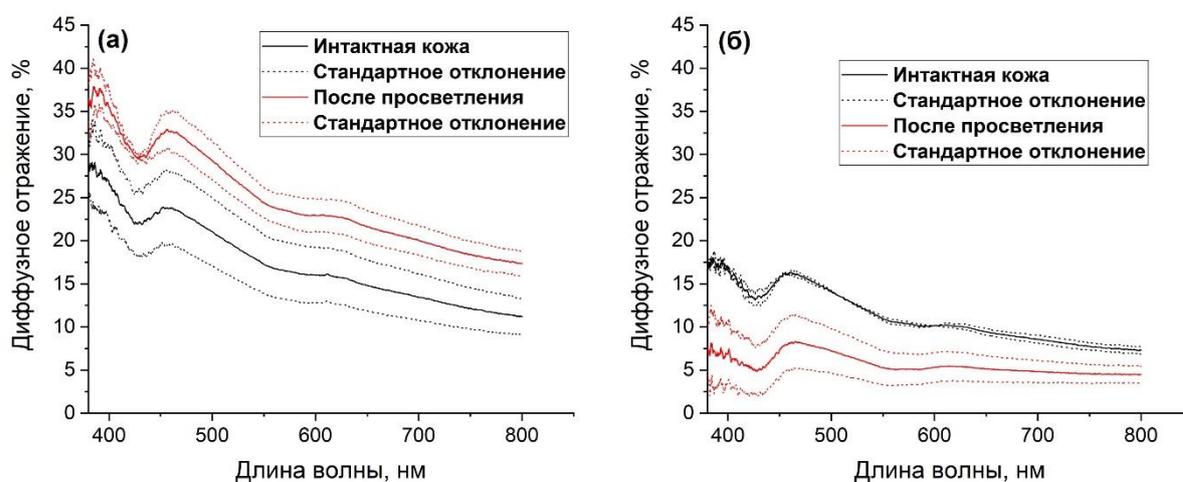


**Рисунок 48.** Фотографии модельной меланомы мыши: (а) *in vivo* на третий день после инъекции суспензии опухолевых клеток; через 7 дней после инъекции опухолевых клеток (б) *in vivo* до просветления; через 7 дней после инъекции опухолевых клеток (в) *in vivo* после просветления; через 14 дней после инъекции опухолевых клеток (г) *ex vivo* до просветления; через 14 дней после инъекции опухолевых клеток (д) *ex vivo* после просветления.

Экспериментальный протокол состоял из двух этапов (Рисунок 48). Первый этап был осуществлён на 7 день после подкожной инъекции взвеси опухолевых клеток и был выполнен *in vivo*. Анестезирование животных было осуществлено путём внутрибрюшинной инъекции смеси растворов Zoletil 50 (Virbac, Франция) и Ксила (De Adelaar, Нидерланды) по дозировке, указанной в инструкции. Второй этап был осуществлён *ex vivo* на 14 день после подкожной инъекции взвеси опухолевых клеток. Для выведения животных из эксперимента было произведено внутривенное введение сверхдозы раствора миорелаксанта Ксила (De Adelaar, Нидерланды).

В начале каждого из этапов участки кожи с меланомой предварительно выбривались. Перед тестированием участки кожи были обработаны этанолом. Затем спектральный зонд располагался в контакте с центральной частью областей кожи с подкожной меланомой и производилась регистрация спектров диффузного отражения интактной кожи (момент времени  $t_0$ ). Аналогичные спектры диффузного отражения были так же зарегистрированы вблизи от области локализации меланомы на здоровых участках кожи. После этого исследуемые здоровые и поражённые области кожи подвергались дермабразии в течение 1 минуты для нарушения целостности рогового слоя. После этого следовала регистрация очередных спектров

диффузного отражения. Далее, два участка кожи мыши, поражённые меланомой, а также соседние здоровые участки кожи обрабатывались ультразвуком в течение 5 минут. В процессе обработки ультразвуком на кожу под УЗ-зондом наносилось 200 мкл смеси ОПА+энхансер. Для каждой смеси ОПА было исследовано 2 поражённых участка кожи (и 2 соседних здоровых участка) каждой из мышей. 2 участка кожи с меланомой одной мыши были использованы для контрольных измерений без оптического просветления. После УЗ-просветления с каждого участка кожи регистрировались итоговые спектры (момент времени  $t_2$ ) диффузного отражения (Рисунок 49).



**Рисунок 49.** Усреднённые спектры диффузного отражения кожи мыши *in vivo* (сплошные линии) в начальный момент времени (чёрный цвет) и после оптического просветления смесью Глюкоза/ОК/ПП с помощью УЗ (красный цвет) с соответствующими стандартными отклонениями (пунктирные линии) здоровой кожи (а) и участков кожи с меланомой (б).

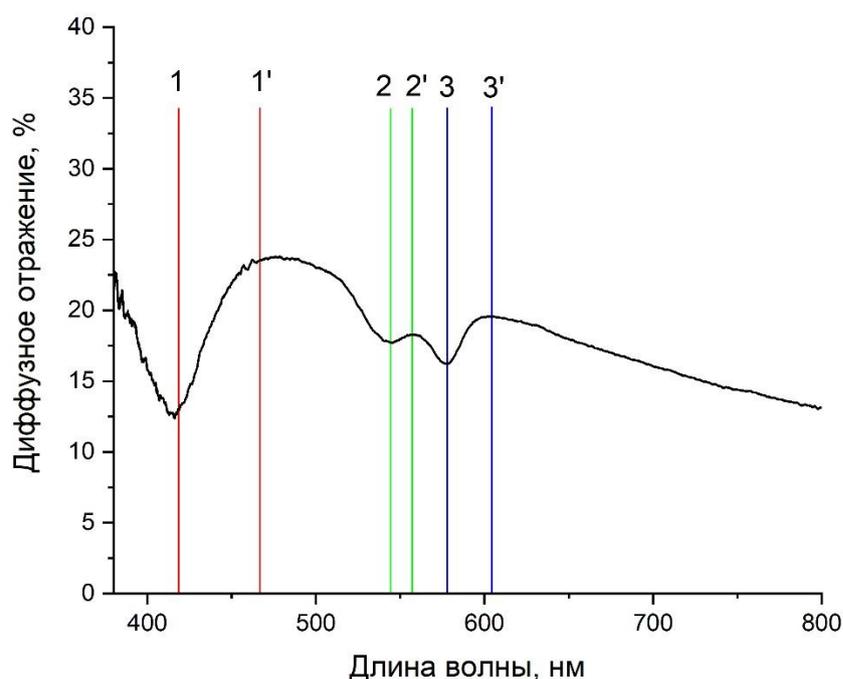
#### 4.2.5. Анализ полученных данных

Для полученных спектров диффузного отражения были подсчитаны коэффициенты наклона спектральной кривой в диапазонах 470-520 нм и 650-800 нм. Данные значения наклона спектральных кривых используются в литературе для дифференциации между здоровой кожей и пигментными новообразованиями (в частности, меланомой) [87]. Так, для спектров диффузного отражения меланомы в диапазоне 470–520 нм свойственным критерием дифференциации является снижение степени наклона по сравнению со здоровой кожей, а в диапазоне 650-800 нм – изменение знака наклона относительно здоровой кожи. Для сравнения эффектов оптического просветления, вызванных различными ОПА, использованными в данном исследовании, была подсчитана разница в наклоне в обоих указанных спектральных диапазонах между моментом времени  $t_2$  (измерение после УЗ-просветления) и  $t_0$  (интактная кожа).

Полученная разница усреднялась по 2 соответствующим участкам здоровой или поражённой меланомой кожи в соответствии с использованным ОПА.

Также, из полученных спектров диффузного отражения были извлечены значения коэффициента отражения, связанные с поглощением крови, на полосах 420 нм (полоса Соре гемоглобина), 545 нм и 575 нм (Q-полосы оксигемоглобина). Данные полосы являются сравнительными «маркерами» пигментных новообразований кожи, так как по сравнению со спектрами здоровой кожи, регистрируемыми вблизи от поражённого участка, данные области демонстрируют более низкий уровень диффузного отражения [7], [87]. Для оценки эффекта оптического просветления на степень различий между сигналом диффузного отражения, полученного от данных маркерных полос здоровых участков кожи и участков кожи с меланомой, было подсчитано соотношение  $R_{benign}(\lambda = 420 \text{ nm})/R_{melanoma}(\lambda = 420 \text{ nm})$ , где  $R_{benign}(\lambda = 420 \text{ nm})$  – значение коэффициента диффузного отражения, зарегистрированного на участке здоровой кожи на длине волны 420 нм, а  $R_{melanoma}(\lambda = 420 \text{ nm})$  – значение коэффициента диффузного отражения, зарегистрированного на смежном участке кожи с меланомой на длине волны 420 нм. Аналогичное соотношение было подсчитано для двух других полос – 545 нм и 575 нм. Полученные на двух участках кожи каждой из мышей соотношения (для каждого ОПА) были усреднены в соответствии с длиной волны.

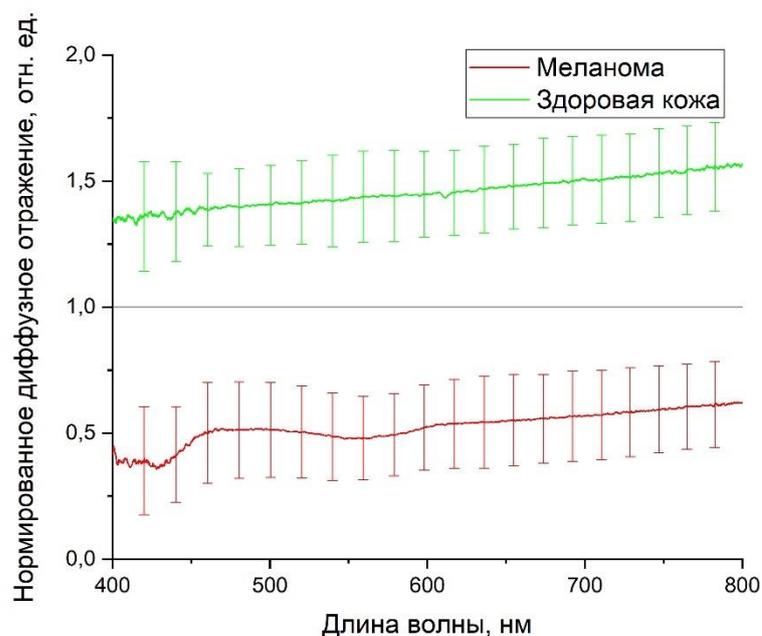
Для численной оценки влияния эффекта оптического просветления на спектральную выраженность (различимость) упомянутых пиков поглощения крови, из спектров диффузного отражения были дополнительно извлечены значения коэффициентов отражения на локальных максимумах, расположенных в непосредственной близости от пиков поглощения крови (Рисунок 50). Затем, были подсчитаны три соотношения  $R(x')/R(x)$  усреднённых по 2 участкам кожи (для каждого ОПА и каждого момента времени экспериментального протокола) коэффициентов отражения для каждого из пиков поглощения крови, где  $x$  – длина волны, соответствующая пику поглощения крови,  $x'$  – длина волны смежного максимума спектра диффузного отражения из Рисунка 50. Наконец, было подсчитано процентное изменение между соотношениями, соответствующими моменту времени  $t_2$  (после УЗ – просветления), и соотношениями в момент времени  $t_0$  (интактная кожа).



**Рисунок 50.** Пики поглощения крови: 1 – 420 нм (полоса CoFe), 2 – 545 нм, 3 – 575 нм; соответствующим им смежные максимумы спектра диффузного отражения кожи: 1' – 465 нм, 2' – 557 нм, 3' – 605 нм.

#### 4.3. Результаты и обсуждение

Все использованные смеси ОПА+энхансер вызвали эффект просветления. На рисунке 51 представлены иллюстративные спектры диффузного отражения после просветления раствором Глюкоза/ОК/ПГ, нормированные на соответствующие спектры интактной кожи (спектры здоровой кожи и меланомы в начальный момент времени). Как и ожидалось, общая интенсивность спектров диффузного отражения, зарегистрированная на участке кожи с модельной меланомой после просветления, снизилась. Учитывая пространственную конфигурацию модельной меланомы, расположенной под слоем дермы (что было подтверждено ОКТ-визуализацией в процессе эксперимента), это свидетельствует о снижении общего рассеяния расположенных над меланомой слоёв кожи. После просветления глубина проникновения фотонов в ткань увеличилась – относительно измерений на интактных участках всё больше фотонов излучения достигло слоя кожи с меланомой, где были поглощены. Как результат, меньше фотонов было рассеяно обратно/отражено и достигло приёмника.

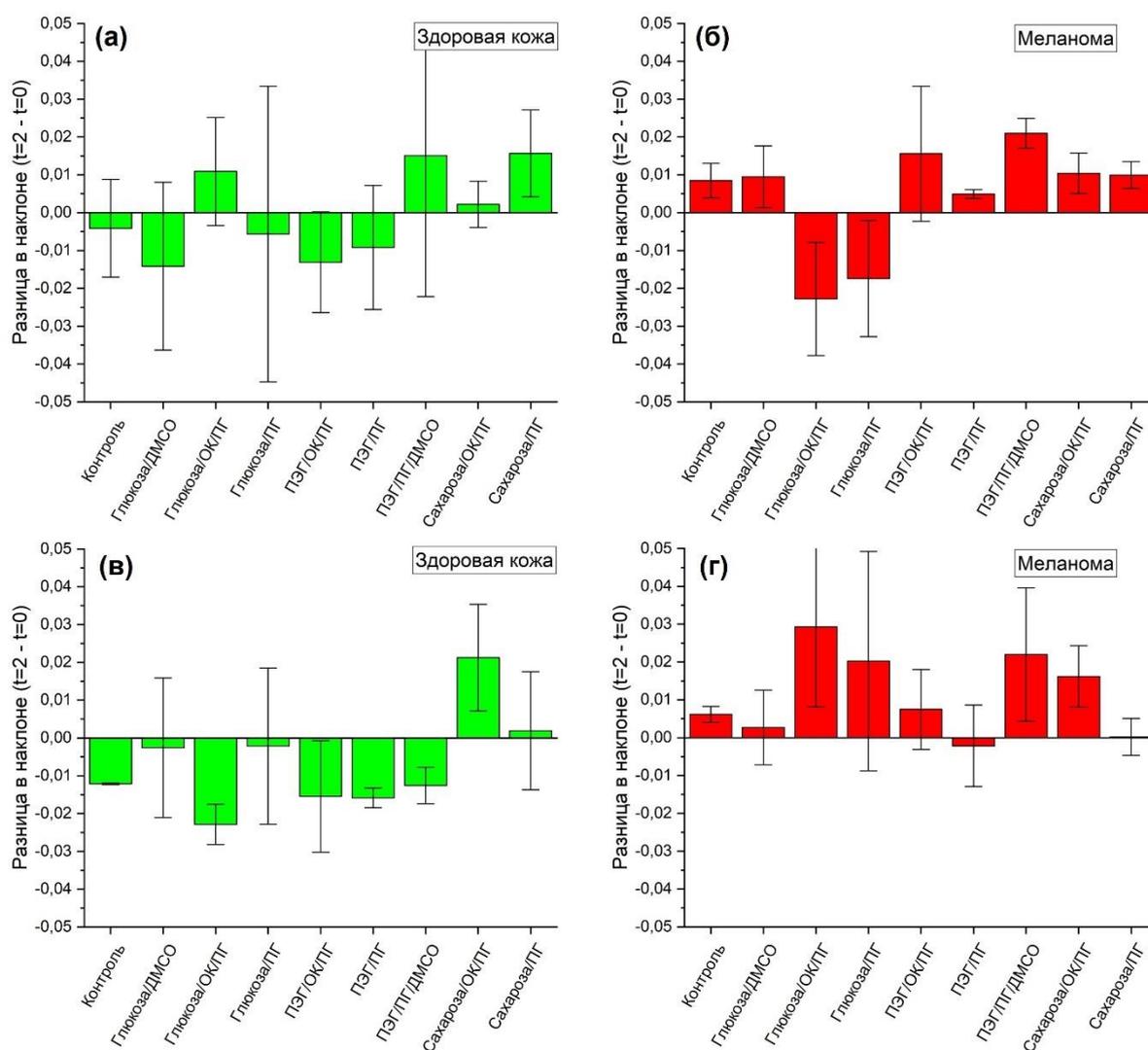


**Рисунок 51.** Усреднённые нормированные на начальное значение спектры диффузного отражения здоровой кожи *ex vivo* и участков кожи *ex vivo* с меланомой, снятые после просветления смесью Глюкоза/ОК/ПГ.

Гистограммы изменения углового коэффициента спектров диффузного отражения кожи мышей в диапазоне 470–520 нм после оптического просветления, усреднённые по 2 участкам кожи для каждой смеси ОПА+энхансер и каждого из этапов (7-й день после инъекции опухолевых клеток – *in vivo* протокол, 14-й день после инъекции опухолевых клеток – *ex vivo* протокол) представлены на рисунке 52. Здесь, критерием эффективности оптического просветления в рамках одного этапа экспериментального протокола может служить снижение углового коэффициента данного спектрального диапазона для участков кожи с меланомой после воздействия ОПА на фоне роста (или его отсутствия) наклона в том же диапазоне для смежных участков здоровой кожи. Такое поведение демонстрируют лишь столбцы гистограммы, соответствующие применению смесей Глюкоза/ОК/ПГ и Глюкоза/ПГ для просветления *in vivo* участков кожи мышей с меланомой: наклон кривой диффузного отражения после просветления относительно интактной кожи здесь снизился на 55% и 30%, соответственно (рисунок 52 (б)). В то же время, соответствующие участки здоровой кожи не показали сильного снижения при воздействии этих смесей. Остальные ОПА привели к росту наклона спектральной кривой после просветления в этом диапазоне для спектров отражения участков кожи с меланомой. Это противоречит описанной в литературе [87] концепции использования наклона в данной спектральной области в качестве критерия дифференциации на здоровую кожу и меланому – спектры диффузного отражения, зарегистрированные на участках кожи с меланомой в этом случае не увеличили своё отличие в угловом коэффициенте после ОП от здоровой кожи. Таким образом, только 2 из использованных биосовместимых

смесей ОПА+усилитель проницаемости на основе раствора Глюкозы продемонстрировали схожий эффект просветления на дифференциацию участки кожи с меланомой в *in vivo* этапе. Стоит отметить, что добавление олеиновой кислоты в качестве усилителя проницаемости в смесь Глюкоза/ОК/ПГ увеличило эффект от просветления в ~2 раза (в процентном изменении) по сравнению со смесью Глюкоза/ПГ, где в качестве усилителя проницаемости был использован только пропиленгликоль. Это отличие согласовывается с преимуществом использования олеиновой кислоты, продемонстрированным в главе 3 настоящей работы, с сахарами для просветления «глубоких» слоев кожи *in vivo*. ОК в данном случае повышает проницаемость рогового слоя для ОПА, не вызывая, однако, сильной дегидратации, в отличие от других химических усилителей проницаемости. Отличия эффекта смесей ОПА, содержащих в себе глюкозу в качестве гиперосмотического агента, от смесей ОПА на основе сахарозы, вызваны, вероятно, разницей в степени воздействия этих двух сахаров на снижение рассеяния кожи, а также в синергетическом эффекте глюкозы с олеиновой кислотой и пропиленгликолем в качестве усилителей проницаемости.

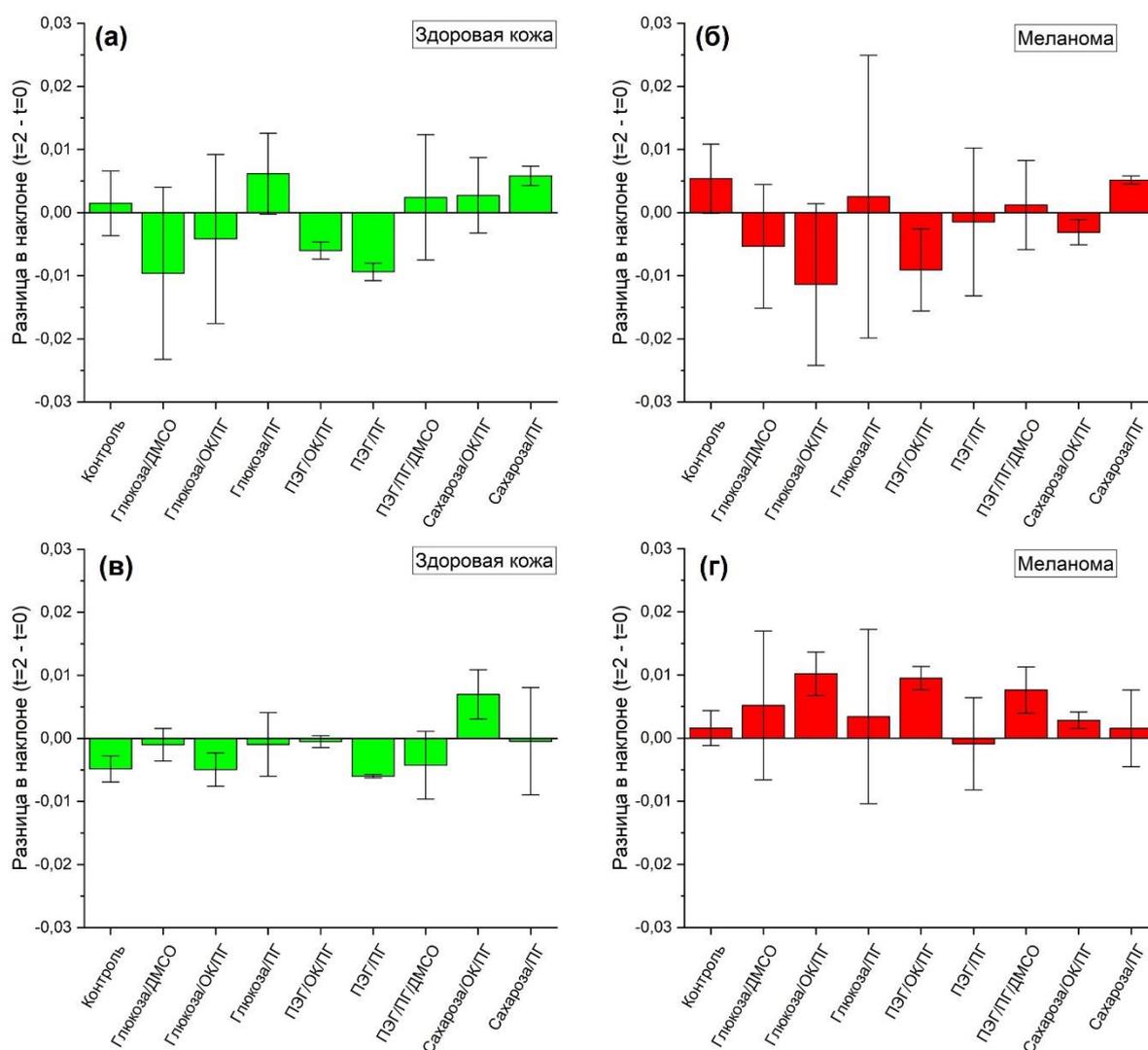
Смеси ОПА+энхансер в том же спектральном диапазоне, но в *ex vivo* этапе не продемонстрировали ожидаемого эффекта (рисунок 52 (в, г)), что, по-видимому, связано с особенностью взаимодействия смесей ОПА с *ex vivo* тканью. Контрольные измерения также продемонстрировали определённые изменения относительно начального момента времени, что, по нашему мнению, связано с небольшим объёмом статистической выборки, возможным влиянием давления спектрального зонда, а также со сдвигом положения спектрального зонда на поверхности кожи при последующих измерениях относительно начального. Это может вносить сомнения в методологию эксперимента в дальнейших исследованиях, и может быть устранено оптимизацией подхода к расположению зонда в фиксированной области, а так же увеличением выборки. Однако, в данном пилотном исследовании этот эффект хоть и наблюдался, однако не поставил под сомнение основные результаты, полученные при использовании признанных по итогу исследования наиболее эффективными оптических просветляющих агентов. Тем не менее, стоит принять во внимание, что результаты, полученные при использовании некоторых ОПА, не согласующиеся с концепцией увеличения различий в наклоне спектральных участков здоровой кожи и кожи с меланомой после просветления, были признаны несущественными в том числе и потому, что были схожи по амплитуде и направлению изменений с контрольными результатами.



**Рисунок 52.** Гистограммы усреднённого изменения углового коэффициента спектров диффузного отражения в диапазоне 470 – 520 нм после оптического просветления в *in vivo* этапе (сверху) и *ex vivo* этапе (снизу) экспериментального протокола для каждой смеси ОПА + энхансер: здоровая кожа (а, в) и участки кожи с модельной меланомой (б, г).

Аналогичные гистограммы, но для спектрального диапазона 650-800 нм, представлены на рисунке 53. Здесь, критерием эффективности оптического просветления в рамках одного этапа экспериментального протокола может служить изменение знака наклона (или просто его рост) данного спектрального диапазона для участков кожи с меланомой после воздействия ОПА на фоне снижения (или отсутствия роста) наклона в том же диапазоне для смежных участков здоровой кожи. В отличие от результатов, представленных на рисунке 53, на *in vivo* этапе (рисунок 53 (а, б)) здесь не было продемонстрировано ощутимого просветляющего воздействия смесями ОПА+энхансер на наклон спектральной кривой. Небольшой рост был достигнут только при использовании смеси Сахароза/ППГ. Контрольные измерения не привели к значительным изменениям. Однако измерения, произведённые в условиях *ex vivo* (на 14 день после инъекции опухолевых клеток) дали ощутимый эффект. Почти все из использованных

агентов (за исключением смеси ПЭГ/ПГ) продемонстрировали рост наклона спектральной кривой после оптического просветления на участках кожи с меланомой (рисунок 53 (г)). В то же время на участках здоровой кожи практически везде наблюдалось снижение наклона (рисунок 53 (в)). На основе гистограммы, наилучшие результаты увеличения наклона после просветления участков кожи с меланомой опять продемонстрировала смесь Глюкоза/ОК/ПГ, а также смеси ПЭГ/ОК/ПГ и ПЭГ/ПГ/ДМСО. Наклон кривой диффузного отражения в данном диапазоне после просветления относительно интактной кожи здесь увеличился, соответственно, на 70%, 41% и 42%.

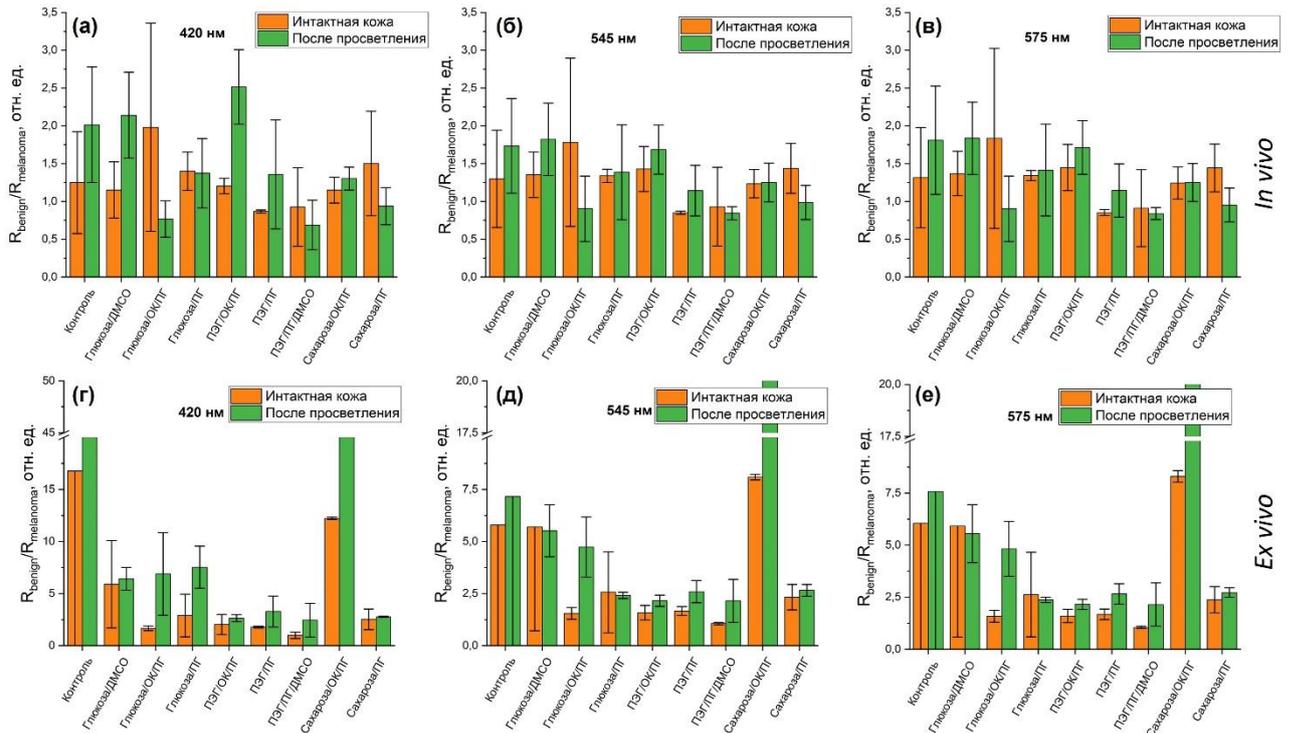


**Рисунок 53.** Гистограммы усреднённого изменения углового коэффициента спектров диффузного отражения в диапазоне 650 - 800 нм после оптического просветления в *in vivo* этапе (сверху) и *ex vivo* этапе (снизу) экспериментального протокола для каждой смеси ОПА + энхансер: здоровая кожа (а, в) и участки кожи с модельной меланомой (б, г).

Это интересное наблюдение, так как наибольший эффект снова был достигнут при применении олеиновой кислоты в качестве усилителя проницаемости. Диметилсульфоксид и пропиленгликоль, используемые в качестве химических усилителей проницаемости в смеси

ПЭГ/ПГ/ДМСО, способны взаимодействовать с липидами рогового слоя кожи и усиливать проникновение гидрофильных ОПА [30], [34], [262]. Вероятно, сочетание этих двух энхансеров вызвало синергетический эффект просветления, даже при использовании низких, биосовместимых концентраций.

Гистограммы усреднённых отношений  $R_{benign}/R_{melanoma}$ , подсчитанных для длин волн 420 нм, 545 нм и 575 нм для каждой смеси ОПА+энхансер для *in vivo* и *ex vivo* этапов эксперимента представлены на рисунке 54.



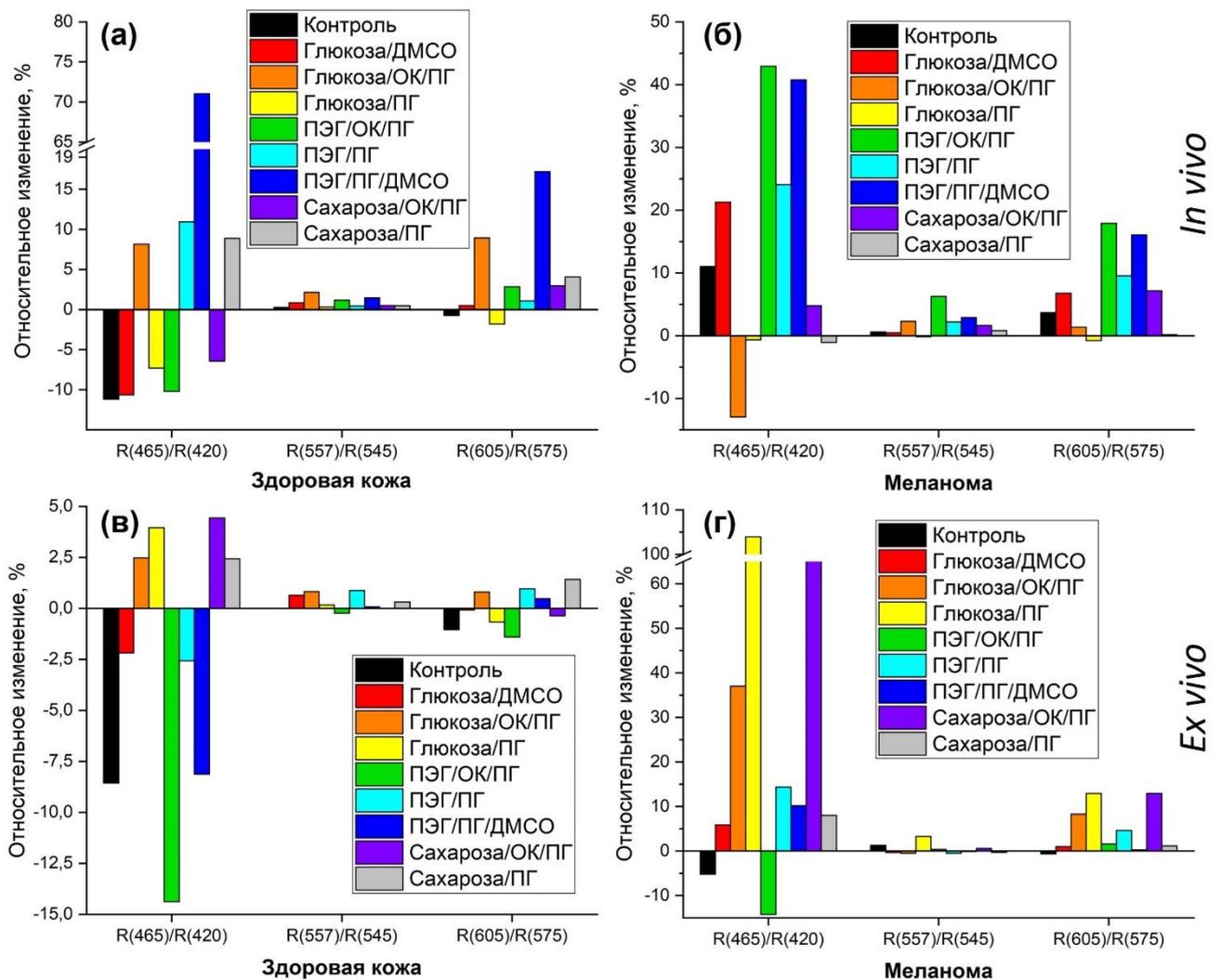
**Рисунок 54.** Гистограммы усреднённых отношений  $R_{benign}/R_{melanoma}$ , подсчитанных для длин волн 420 нм (а, г), 545 нм (б, д) и 575 нм (в, е) для каждой смеси ОПА+энхансер для *in vivo* и *ex vivo* этапов эксперимента.

Все смеси ОПА в разной степени после просветления продемонстрировали увеличение различий в сигнале диффузного отражения от трёх пиков поглощения крови между участками кожи с меланомой и здоровой кожей. Контрольные измерения также продемонстрировали изменения, однако они скорее вызваны разбросом значений из-за морфологических вариаций кожи мыши и небольшой статистической выборкой. Наибольшие различия после просветления кожи *in vivo* продемонстрировала смесь ПЭГ/ОК/ПГ (увеличение после просветления относительно интактной кожи в ~2 раза для полосы Core гемоглобина (рисунок 54 (а))). На двух Q-полосах гемоглобина эти изменения не так выражены: здесь наибольшие схожие значения достигнуты смесями Глюкоза/ДМСО и ПЭГ/ПГ (увеличение на ~34% относительно интактной кожи после просветления).

Наибольшее снижение рассеяния кожи, и, как результат, лучший эффект оптического просветления, на основе анализа относительных изменений соотношения  $R_{benign}/R_{melanoma}$  был

достигнут на *ex vivo* этапе эксперимента смесью Глюкоза/ОК/ПГ. На длинах волн 420 нм, 545 нм и 575 нм относительные изменения соотношения  $R_{benign}/R_{melanoma}$  после просветления составили 314 %, 205 % и 204 %, соответственно. По-видимому, это связано с отсутствием физиологического ответа кожи мыши *ex vivo* на воздействие гиперосмотического агента. Данные результаты согласуются с результатами, представленными в рисунках 52 и 53. Смесей ПЭГ/ПГ/ДМСО и Сахароза/ОК/ПГ также показали значимые отличия после просветления относительно интактной кожи, однако на меньшем уровне (увеличение вплоть до ~260%). Это позволяет сделать вывод о наибольшей эффективности смеси Глюкоза/ОК/ПГ при биосовместимом оптическом просветлении кожи мышей *in vivo* и *ex vivo* с меланомой.

Гистограммы относительных изменений трёх соотношений  $R(x')/R(x)$  интенсивности локальных максимумов и смежных пиков поглощения крови спектров диффузного отражения после оптического просветления представлены на рисунке 55 для каждой смеси ОПА+энхансер.



**Рисунок 55.** Гистограммы относительных изменений трёх соотношений  $R(x')/R(x)$  интенсивности локальных максимумов и смежных пиков поглощения крови (где  $x$  – длина волны, соответствующая пику поглощения крови,  $x'$  – длина волны смежного максимума) спектров диффузного отражения после оптического просветления для каждого ОПА в *in vivo* (а, б) и *ex vivo* (в, г) экспериментальных этапах для здоровой кожи (а, в) и участков кожи с модельной меланомой (б, г).

Наибольшее улучшение после УЗ-просветления спектральной различимости полосы Core гемоглобина в зависимости от экспериментальных условий было достигнуто смесями ПЭГ/ПГ/ДМСО, ПЭГ/ОК/ПГ, ПЭГ/ПГ, Глюкоза/ОК/ПГ и Сахароза/ОК/ПГ (изменение соотношения  $R(465 \text{ нм})/R(420 \text{ нм})$  после просветления вплоть до  $\sim 100\%$ ). Влияние оптического просветления биосовместимыми ОПА на спектральную различимость Q-полос гемоглобина оказалось выражено слабее, чем на полосу Core, но всё равно наблюдаемо. Так, смесями ПЭГ/ОК/ПГ и ПЭГ/ПГ/ДМСО удалось достичь 17% относительного увеличения соотношения  $R(605 \text{ нм})/R(575 \text{ нм})$  при *in vivo* просветлении.

Таким образом, была экспериментально показана возможность оптического просветления меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo* биосовместимыми ОПА в сочетании с химическими и физическими усилителями проницаемости.

#### 4.4. Выводы

Были представлены результаты исследования влияния оптического просветления биосовместимыми смесями ОПА и химических усилителей проницаемости (энхансеров) модельной меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo*. В качестве ОПА были использованы полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ) и водные растворы глюкозы и сахарозы. В качестве энхансеров были использованы пропиленгликоль (ПГ), олеиновая кислота (ОК) и диметилсульфоксид (ДМСО). Для усиления проницаемости рогового слоя были использованы дермабразия и сонофорез. Путём анализа изменений в угловом коэффициенте спектров диффузного отражения в диапазонах 470–520 нм и 650–800 нм после оптического просветления была оценена эффективность биосовместимых смесей энхансеров и ОПА в *ex vivo* и *in vivo* экспериментальных этапах. Наклон кривой диффузного отражения в диапазоне 470–520 нм после просветления смесью Глюкоза/ОК/ПГ относительно интактной кожи *in vivo* снизился на 55%, позволив наиболее точно численно дифференцировать участок расположения меланомы. Смеси ОПА+энхансер в том же спектральном диапазоне, но в *ex vivo* этапе не продемонстрировали ожидаемого эффекта, что, по-видимому, связано с особенностью взаимодействия смесей ОПА с *ex vivo* тканью. В спектральном диапазоне 650–800 нм на *in vivo* этапе не было продемонстрировано ощутимого просветляющего воздействия смесями ОПА+энхансер на наклон спектральной кривой. Однако, измерения, произведённые в условиях *ex vivo*, продемонстрировали эффект просветления почти всеми смесями ОПА. Наилучшие результаты увеличения наклона (70%) после просветления участков кожи с меланомой продемонстрировала смесь Глюкоза/ОК/ПГ.

Все смеси ОПА в разной степени после просветления продемонстрировали увеличение различий в сигнале диффузного отражения от трёх пиков поглощения крови между участками

кожи с меланомой и здоровой кожей. Лучший эффект оптического просветления был достигнут на *ex vivo* этапе эксперимента смесью Глюкоза/ОК/ПГ. На длинах волн 420 нм, 545 нм и 575 нм относительные изменения соотношения  $R_{benign}/R_{melanoma}$  после просветления составили 314 %, 205 % и 204 %, соответственно.

Наибольшее улучшение после УЗ-просветления спектральной различимости полос поглощения крови в зависимости от экспериментальных условий было достигнуто смесями ПЭГ/ПГ/ДМСО, ПЭГ/ОК/ПГ, ПЭГ/ПГ, Глюкоза/ОК/ПГ и Сахароза/ОК/ПГ.

Таким образом, была экспериментально показана возможность биосовместимого оптического просветления меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo* смесями ОПА с клинически допустимыми концентрациями.

## **ГЛАВА 5. Экспериментальное исследование увеличения глубины детектирования нано- и субмикронных частиц в коже при ОКТ-визуализации с помощью оптического просветления**

### **5.1. Введение**

Нано- и субмикронные частицы в настоящее время широко используются как для создания солнцезащитных фильтров, так и в качестве носителей лекарственных препаратов [284], [285]. Одним из путей трансэпидермальной доставки данных наночастиц в дерму кожи является их проникновение по волосяным фолликулам [285]–[287]. Однако оптический контроль заполнения фолликулов наночастицами достаточно затруднен благодаря сильному светорассеянию в коже. Таким образом, целью работы является, после предварительного исследования на наночастицах диоксида титана, исследование возможности увеличения оптической глубины детектирования субмикронных частиц карбоната кальция в волосяном фолликуле с помощью оптической когерентной томографии при оптическом просветлении кожи гидрофильными и липофильными ОПА.

### **5.2. Методы и материалы**

#### **5.2.1. Тестовое исследование с использованием наночастиц диоксида титана**

##### *5.2.1.1. Суспензии наночастиц*

В качестве исследуемых частиц использовались наночастицы диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ ) (Sigma-Aldrich, США) диаметром  $\sim 25$  нм. На длине волны 930 нм показатель преломления частиц составляет 2.49 [288].

В качестве основы для приготовления суспензии исследуемых частиц использовались ПЭГ-300 с молекулярным весом 300 Да (Sigma-Aldrich, США), ПЭГ-400 с молекулярным весом 400 Да (Sigma-Aldrich, США) и смесь ПЭГ-400 и ДМСО (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 80% и 20%, соответственно. Значения показателей преломления жидкостей на длине волны 930 нм составили 1.4559 (ПЭГ-300), 1.4581 (ПЭГ-400) [258] и 1.460 (ПЭГ-400 + ДМСО). Концентрация наночастиц во всех суспензиях составила 0.5 г/мл.

##### *5.2.1.2. Подготовка объекта исследования*

В работе использовались лабораторные крысы альбиносы *ex vivo* и *in vivo* весом 250-300 г. Перед началом исследования с поверхности тела крыс с помощью крема-депилятора «Veet» (Reckitt Benckiser, Франция) тщательно удалялся волосяной покров. На каждом животном

выделялись по два участка, экспериментальный и контрольный. Диаметр участков составлял приблизительно 3 см.

В исследованиях *in vivo* крысы были предварительно анестезированы раствором Zoletil 50 (Virbac, Франция) дозой 0.05 мг/кг.

Проводимые экспериментальные исследования были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» (протокол № 8 от 10.04.2018 г.).

#### *5.2.1.3. Исследование оптической глубины детектирования наночастиц ex vivo*

В данном эксперименте были использованы три лабораторные крысы *ex vivo*. Подготовленная суспензия  $\text{TiO}_2$  на основе ПЭГ-300 наносилась на поверхность кожи крысы и обрабатывалась непрерывным УЗ излучением частотой 1 МГц, мощностью 1 Вт в течение 1 минуты с помощью УЗ устройства Dinatron 125 (Dinatronics, США). Затем проводилось ОКТ-сканирование обрабатываемого участка, и процедура повторялась. Общая продолжительность УЗ обработки составляла 8 минут. Перед сканированием суспензия тщательно удалялась для предотвращения потери интенсивности ОКТ-сигнала из глубины кожи за счёт повышения отражения зондирующего излучения от поверхности.

#### *5.2.1.4. Исследование оптической глубины детектирования наночастиц in vivo*

В эксперименте использовались две лабораторные крысы *in vivo*. Суспензия  $\text{TiO}_2$  на основе ПЭГ-300 наносилась на экспериментальные участки кожи крысы, которые подвергались воздействию УЗ в аналогичном режиме два раза в течение 2 минут. ОКТ-мониторинг экспериментального участка проводился до нанесения частиц, а также между УЗ облучениями и после окончания облучения.

#### *5.2.1.5. Исследование увеличения оптической глубины детектирования наночастиц ex vivo с помощью оптического просветления кожи*

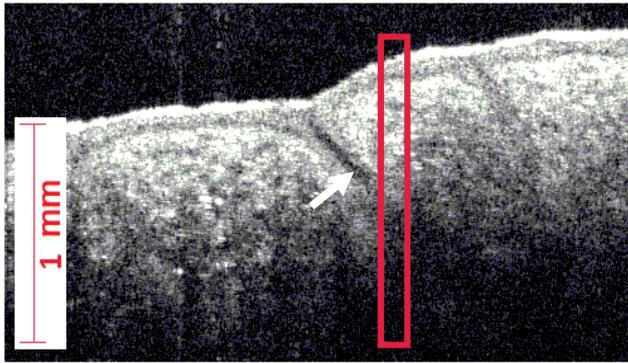
В данном эксперименте использовались пять лабораторных крыс *ex vivo*. В качестве иммерсионных агентов использовались ПЭГ-400 и смесь ПЭГ-400 и ДМСО. На экспериментальные участки кожи крыс наносилась суспензия частиц на основе ПЭГ-400 или смеси ПЭГ-400 и ДМСО и подвергалась воздействию УЗ в течение 1 минуты. Затем суспензия удалялась, и на область воздействия наносился соответствующий иммерсионный агент. С помощью ОКТ проводился мониторинг изменения оптической глубины детектирования участков локализации наночастиц в фолликулах в течение 1 часа с интервалом 5 минут. На контрольные участки кожи наносился только иммерсионный агент.

### 5.2.1.6. Методика определения оптической глубины детектирования наночастиц

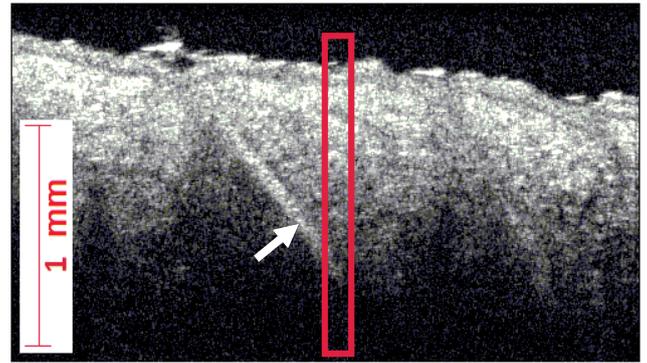
Для визуализации областей локализации наночастиц в фолликулах использовался спектральный оптический когерентный томограф Thorlabs OCP930SR (Thorlabs, США) с центральной длиной волны излучения 930 нм, шириной спектра излучения на полувысоте 100 нм, продольным разрешением 6.2 мкм, поперечным разрешением 9.6 мкм на воздухе и длиной области сканирования 2 мм.

Методика определения оптической глубины детектирования участков локализации наночастиц представлена в работе [289], а также проиллюстрирована на рисунке 56. На рисунках 56(а) и 56(б) представлены ОКТ изображения участков кожи с фолликулами. На изображении (а) незаполненный фолликул выглядит как наклонный затемнённый объект с меньшей интенсивностью ОКТ-сигнала по отношению к окружающей ткани и малым контрастом визуализации (отмечен стрелкой). При заполнении фолликулов суспензией наночастиц, контраст их визуализации значительно увеличивается как за счёт высокой отражательной способности наночастиц  $\text{TiO}_2$ , так и за счёт более высоких значений показателя преломления используемых суспензий наночастиц по сравнению с показателем преломления дермы ( $\sim 1.4$  [30]). На изображении (б) фолликул выглядит как яркое белое образование (отмечен стрелкой). На изображениях (в) и (г) показаны А-сканы, усреднённые по выделенным участкам на изображениях (а) и (б). Наиболее высокий пик соответствует сигналу, отражённому от поверхности кожи. Интенсивность ОКТ-сигнала в целом снижается с увеличением глубины проникновения света в ткань в соответствии с функцией  $\exp(-\mu_t z)$ , где  $\mu_t$  – коэффициент ослабления,  $z$  – глубина проникновения света в ткань [43]. Участки с меньшим рассеянием выглядят как провалы на графике, а локальная рассеивающая неоднородность соответствует пику (рисунок 54(г)).

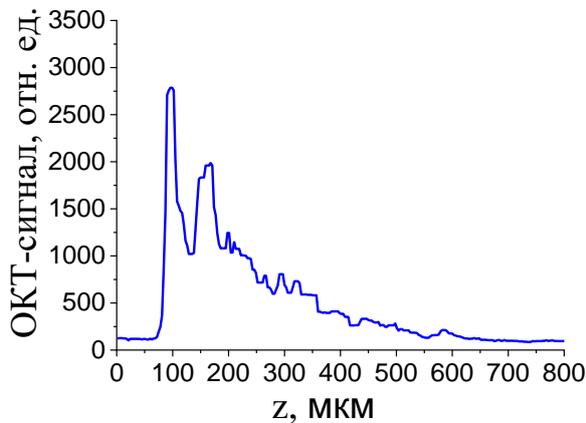
Оптическая глубина ( $\delta$ ) детектирования наночастиц внутри фолликула определялась как расстояние между максимумами интенсивности ОКТ-сигнала от поверхности кожи и от наиболее глубоко залегающего контрастного объекта в фолликуле.



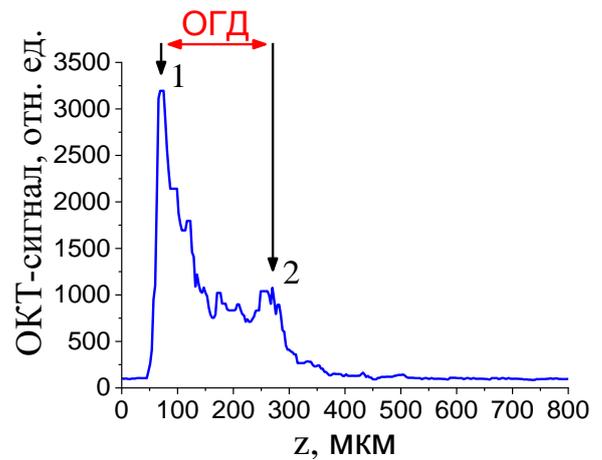
(a)



(б)



(в)



(г)

**Рисунок 56.** (а) ОКТ - изображение участка кожи с фолликулом (прямоугольником обозначена исследуемая область, включающая в себя незаполненный волосной фолликул); (б) ОКТ - изображение участка кожи с фолликулом, заполненным суспензией наночастиц  $\text{TiO}_2$  (прямоугольником обозначена исследуемая область, включающая в себя нижнюю видимую часть волосного фолликула, стрелками обозначены изображения фолликулов); (в) Зависимость интенсивности ОКТ-сигнала от глубины, усреднённой по исследуемой области, отмеченной на изображении (а); (г) Зависимость интенсивности ОКТ-сигнала от глубины, усреднённой по исследуемой области, отмеченной на изображении (б): 1 соответствует пику от поверхности кожи, 2 соответствует пику от суспензии наночастиц, локализованной внутри фолликула, ОГД - оптическая глубина детектирования частиц.

Значения оптической глубины детектирования наночастиц во всех визуализируемых фолликулах усреднялись по группе, и рассчитывалось среднее квадратичное отклонение.

## 5.2.2. Основной эксперимент с субмикронными частицами карбоната кальция

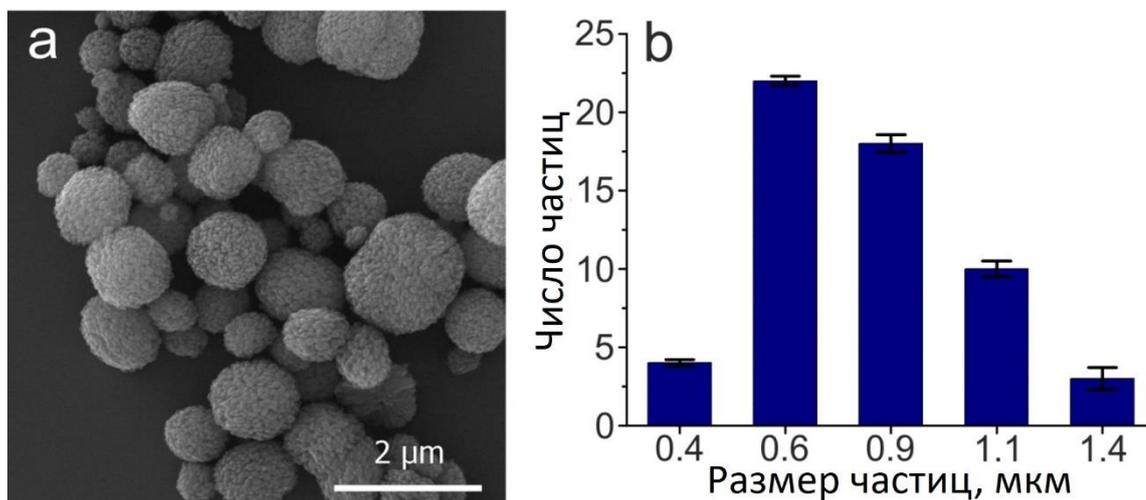
### 5.2.2.1. Материалы

Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), карбонат натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), этиленгликоль (ЭГ), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 400 Да (ПЭГ-400), диметилсульфоксид 99% (ДМСО) и минеральное масло (ММ) были приобретены у Sigma-Aldrich (США). Также были использованы тиазон

(Guangzhou Heming Trading Co. Ltd., Китай), олеиновая кислота (ОК) (Oleon, Radiacid, Бельгия), краситель Cyanine 7 (Cy7) (Lumiprobe GmbH, Германия) и вода Milli-Q. (Система очистки Milli-Q, Millipore, Merck, США).

#### 5.2.2.2. Частицы

Субмикронные частицы  $\text{CaCO}_3$  были синтезированы осаждением из смеси эквимольных растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в присутствии ЭГ в реакционном растворе [290]. Были сформированы носители диаметром  $0,8 \pm 0,3$  мкм с пористой структурой (Рисунок 57). Изображения частиц были получены на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) MIRA II LMU (Tescan, Чехия) с рабочим напряжением 20 кВ и диапазоном увеличения от 100 до 40000 крат. Распределение синтезированных частиц по размерам было получено путем анализа СЭМ-изображений с использованием программного обеспечения Image J не менее чем для 100 частиц. Средний размер был показан как «среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение».



**Рисунок 57.** (а) СЭМ–изображение полученных частиц  $\text{CaCO}_3$  и (b) гистограмма их распределения по размерам.

#### 5.2.2.3. Оптические просветляющие агенты

В качестве ОПА были приготовлены десять различных веществ. Выбор иммерсионных компонентов и усилителей основывался на литературных данных и собственном опыте.

Исследуемые ОПА были разделены на три группы: 1) чистый ПЭГ-400 и с ДМСО или Тиазоном; 2) только ММ и с ДМСО; и 3) только ОК и в качестве усилителя для ПЭГ-400. Растворы (смеси) были изготовлены путем смешивания веществ в определенных объемах.

Показатели преломления растворов были измерены на рефрактометре Аббе DR-M2/1550 (Atago, Япония) на длине волны 930 нм при комнатной температуре ( $20^\circ\text{C}$ ) и представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Характеристики ОПА

ОПА	Концентрация, %(объём/объём)	Показатель преломления
ПЭГ-400	100	1.4487
ПЭГ-400/ДМСО	90/10	1.4500
ПЭГ-400/ДМСО	80/20	1.4514
ПЭГ-400/Тиазон	90/10	1.4563
ПЭГ-400/Тиазон	80/20	1.4638
ММ	100	1.4530
ММ/ДМСО	90/10	1.4539
ММ/ДМСО	80/20	1.4548
ОК	100	1.4500
ПЭГ-400/ОК	80/20	1.4490

#### 5.2.2.4. Подготовка объекта исследования

Для исследований *ex vivo* были использованы 10 лабораторных крыс-альбиносов в возрасте 1 года массой 250-300 г. Все животные были предоставлены Биологическим факультетом Саратовского государственного университета и взяты из контрольных групп в других экспериментах сразу после выведения, чтобы исключить специальное умерщвление животных. Эксперименты одобрены Этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета (СГМУ, разрешение № 8 от 10.04.2018). Две равные симметричные области были выбраны на спине каждой крысы. Шерсть с поверхности кожи была удалена с помощью одноразовой бритвы, чтобы сохранить волосяные фолликулы.

Количество частиц  $\text{CaCO}_3$ , наносимых на исследуемый участок кожи, составляло 5 мг. В качестве усилителя проникновения частиц по волосяным фолликулам использовали терапевтический ультразвуковой аппарат Dynatron 125 (Dynatronics, США). Частота УЗ составляла 1 МГц, плотность мощности -  $0,5 \text{ Вт/см}^2$  в непрерывном режиме, время воздействия 2 мин. Параметры режима УЗ были выбраны в результате предварительных экспериментов. Такое сочетание мощности УЗИ и времени воздействия позволило достичь максимальной глубины проникновения частиц  $\text{CaCO}_3$  в фолликулы без разрушения и кристаллизации частиц.

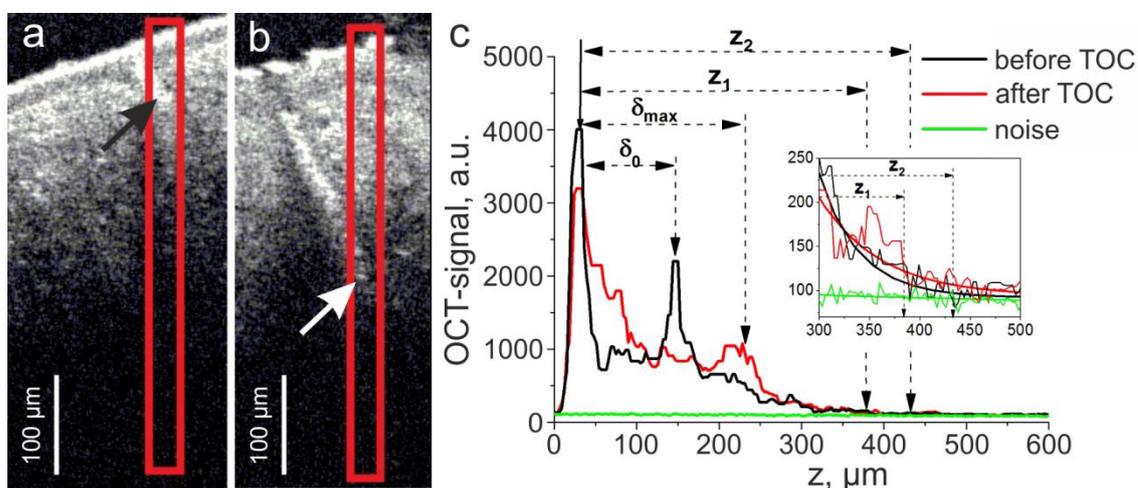
Методика эксперимента состояла из следующих этапов: 1) 200 мкл исследуемой ОПА наносилось на поверхность кожи, 2) 5 мг частиц дополнительно наносилось на тот же участок, 3) участок обрабатывался в течение 2 мин с помощью УЗ, 4) остатки ОПА с частицами удалялись с поверхности кожи ватным диском, и 5) тот же ОПА повторно наносили на этот участок в объеме 200 мкл и экспонировали в течение часа.

Для оценки глубины детектирования частиц без оптического просветления кожи (глубина до просветления) при УЗ-обработке был проведен контрольный эксперимент. 70%-й этанол использовался в качестве жидкости для УЗ-обработки вместо ОПА.

#### 5.2.2.5. ОКТ-визуализация и оценка оптической глубины детектирования и оптической глубины зондирования *ex vivo*

Визуализация проникновения частиц в кожу осуществлялась с помощью прибора спектральной оптической когерентной томографии (ОКТ) ОСР930SR (Thorlabs, США) (см. раздел 5.2.1.6.). Обработанные участки визуализировались перед нанесением частиц и ОПА (или 70%-ного раствора этанола), в конце процедуры внедрения, а также каждые 5 минут в течение 1-часового воздействия ОПА (или 70%-ного раствора этанола) и взвеси частиц.

Оптическая глубина детектирования (ОГД) частиц ( $\delta$ ) внутри волосяных фолликулов, как было уже описано в разделе 5.2.1.6., измерялась как расстояние между двумя максимумами интенсивности на А-скане ОКТ: от поверхности кожи и от наиболее глубоко контрастирующего объекта, расположенного в фолликуле (Рисунок 58). Красный прямоугольник на рисунке 59(a,b) указывает на исследуемую область В-сканов, включая изображение заполненных фолликулов после внедрения с помощью этанола (до просветления) и после ОП, соответственно. На рисунке 58(c) показаны усредненные А-сканы волосяных фолликулов до и после ОП.



**Рисунок 58.** ОКТ-изображения участка кожи с волосяным фолликулом, заполненным субмикронными частицами  $\text{CaCO}_3$ , после их внедрения с помощью этанола (a) и после ОП (b) (красными прямоугольниками отмечены исследуемые участки, включая нижнюю видимую часть волосяного фолликула, стрелками указана локализация частиц). (c) Зависимость интенсивности ОКТ-сигнала от глубины (А-скан), усредненной по площади, отмеченной прямоугольниками на В-сканах (a) и (b):  $\delta_0$  и  $\delta_{\text{max}}$  – оптическая глубина детектирования (ОГД) сразу после внедрения частиц с этанолом и после ОП, соответственно;  $z_1$  и  $z_2$  — оптические глубины зондирования (ОГЗ) после внедрения с помощью этанола и после ОП, соответственно. Before TOC – до ОП, after TOC – после ОП, noise – уровень фонового шума.

Оптическая глубина зондирования (ОГЗ) кожи на ОКТ-изображении ( $z$ ) измерялась как расстояние от поверхности кожи до точки перехода полезного сигнала в фоновый шум

(усредненное отношение сигнал/шум стало равным 1.1). Вставка на рисунке 58(с) показывает увеличенный участок А-сканов с точками перехода до и после ОП для уточнения оценки ОГЗ.

Чтобы оценить влияние различных ОПА, значения ОГД и ОГЗ были оценены на основе измерений, проведенных до и после ОП. Относительное изменение (RC) ОГД определяли как

$$RC_{\text{ОГД}} = \frac{\delta_{\text{max}}}{\delta_0}, \quad (10)$$

где  $\delta_{\text{max}}$  — значение ОГД после ОП, а  $\delta_0$  — начальное значение ОГД, определенное после внедрения частиц с помощью УЗ с использованием этанола в контрольном эксперименте.

Относительное изменение ОГЗ частиц рассчитывали как

$$RC_{\text{ОГЗ}} = \frac{z_2}{z_1}, \quad (11)$$

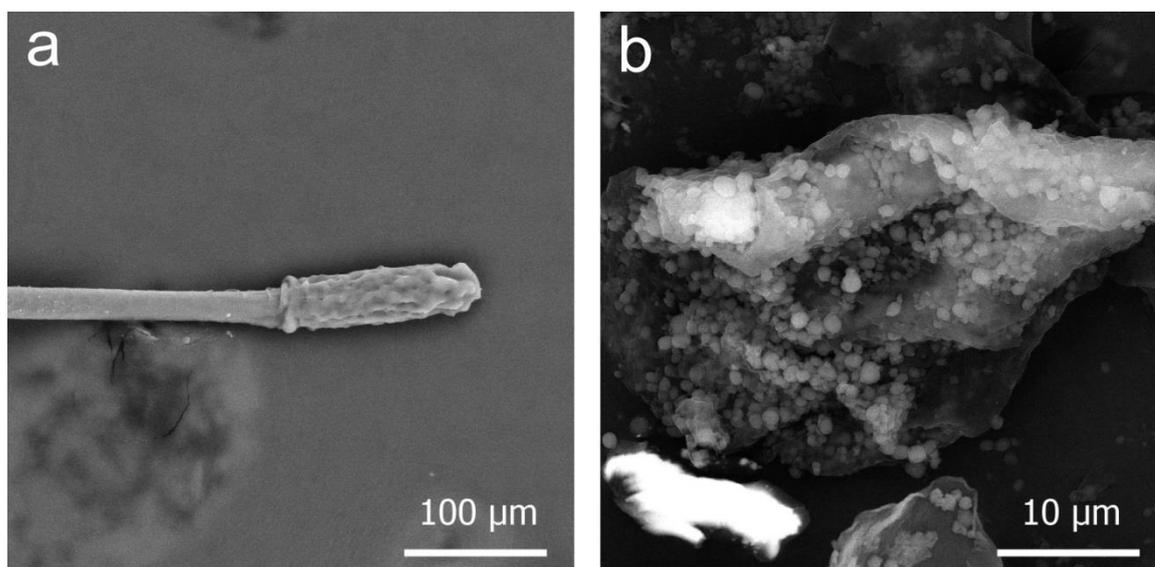
где  $z_1$  и  $z_2$  — значения ОГЗ до и после ОП, соответственно.

#### 5.2.2.6. Эксперимент *in vivo* как доказательство принципа

После экспериментов *ex vivo* наиболее эффективная смесь ОПА была выбрана для измерения *in vivo*, чтобы проверить применимость метода в реальных условиях лечения.

Эксперимент проводился в соответствии с этическими стандартами, изложенными в Женевской конвенции (1971 г.), «Международных рекомендациях по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» (1985 г.), «Хельсинкской декларации по медицинской этике» и «Международных рекомендациях по проведению биомедицинских исследований с использованием лабораторных животных» (1989 г.), а также был одобрен Этическим комитетом СГМУ. Две лабораторные белые крысы были анестезированы Золетилом (Virbac, Франция). Волосы удалялись с поверхности бритвой, фолликулы не разрушались. Количество нанесенных частиц составляло 20 мг. Первая крыса была использована для доказательства проникновения незагруженных носителей в волосяные фолликулы *in vivo*. Был использован один участок кожи на спине. Процедура была аналогична эксперименту *ex vivo*, связанному с доставкой частиц с помощью УЗ с использованием этанола.

Волосяные фолликулы после внедрения частиц извлекали с помощью пинцета, сохраняя корневые влагалища. Образец извлеченных волос помещали на проводящую ленту, прикрепленную к держателю, после чего корневые влагалища механически вскрывались. Морфологию частиц карбоната кальция, внедренных в фолликулы, исследовали с помощью СЭМ. На рисунке 59 представлены СЭМ-изображения извлеченного волосяного фолликула крысы (а) и открытого фолликула (б) после внедрения частиц с помощью УЗ. Видно, что фолликул заполнен частицами. Кроме того, частицы были внедрены без какой-либо потери целостности, так как не наблюдалось никаких изменений в их морфологии.



**Рисунок 59.** СЭМ-изображения (а) волоса, извлеченного из кожи вместе с корневым влагалищем после УЗ-внедрения частиц с использованием этанола *in vivo*; (b) раскрытая корневая оболочка фолликула этого волоса, заполненная частицами  $\text{CaCO}_3$ .

Вторая крыса была использована для оценки глубины проникновения частиц-контейнеров в волосяные фолликулы *in vivo* с помощью ОПА. На контейнеры  $\text{CaCO}_3$  наносили флуоресцентный маркер  $\text{Cu7}$  адсорбционным методом [291].  $\text{Cu7}$  имеет основной пик флуоресценции в ближней инфракрасной (БИК) области, что позволяет визуализировать его в образцах тканей, поскольку фоновая флуоресценция биологической ткани в БИК-области минимальна. Количество  $\text{Cu7}$ , загруженного в частицы  $\text{CaCO}_3$ , оценивалось по флуоресценции. Интенсивность флуоресценции регистрировали при длине волны 772 нм с помощью гибридного многорежимного микропланшет-ридера Synergy H1 (BioTek, США) с возбуждением на 745 нм. Вместимость контейнеров оценивалась как отношение массы  $\text{Cu7}$ , входящего в состав частиц  $\text{CaCO}_3$ , к массе частиц  $\text{CaCO}_3$ , выраженное в процентах. Оно было равно 0.6% массы.

Две симметричные области были выбраны на спине крысы. Трансдермальное внедрение частиц осуществляли в соответствии с процедурами 1-5, описанными в подразделе 5.2.2.4. На первый исследуемый участок поверхностно наносился 70% раствор этанола, на второй – смесь ОПА. Первый экспериментальный участок визуализировался с помощью ОКТ без оптического просветления. ОКТ-мониторинг второго участка проводился в течение 30 минут ОП кожи. В конце этого исследования из области внедрения ОПА были взяты биоптаты кожи с использованием 2-мм пробойников Harris Uni-Core (Whatman) для оценки реальной глубины проникновения частиц. Образцы были заморожены и затем из них были получены вертикальные криосрезы толщиной 30 мкм с помощью криостата Leica CM1950 (Leica Microsystems, Германия). Визуализация криосрезов проводилась с помощью конфокального

лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Leica TCS SP8 (Leica, Германия). Для демонстрации проникновения частиц, нагруженных Су7, в волосяные фолликулы использовали светлое поле и два флуоресцентных канала. Сигнал «синей» флуоресценции регистрировался в диапазоне 420-490 нм при возбуждении на длине волны 405 нм, демонстрируя автофлуоресценцию волосяных стержней. Сигнал «красной» флуоресценции регистрировался в диапазоне 750-795 нм при возбуждении на длине волны 670 нм, что соответствует флуоресценции красителя Су7.

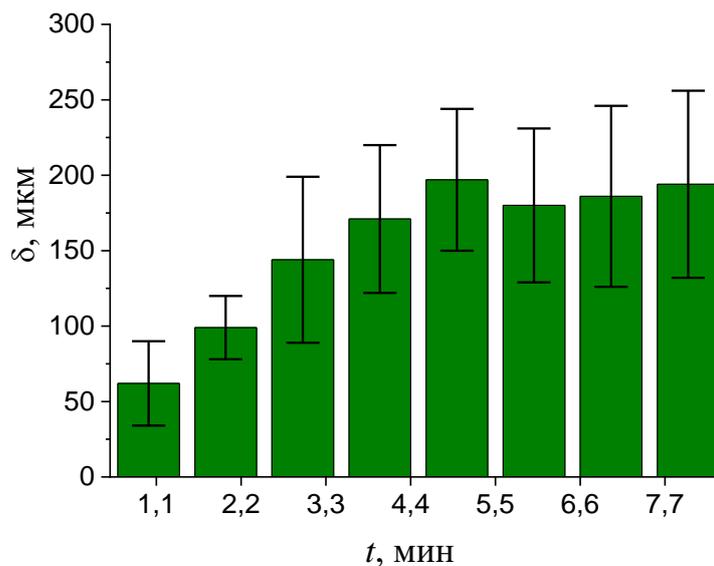
#### *5.2.2.7. Статистический анализ*

Значения  $RC_{огд}$  и  $RC_{огз}$  были рассчитаны для каждого волосяного фолликула, а затем усреднены по каждому ОПА. Все данные были представлены в виде среднего  $\pm$  стандартного отклонения. ANOVA-тест был использован для определения достоверности различий между группами, в которых внедрение производилось с помощью ПЭГ-400 и энхансеров (1-я группа), ММ и энхансер (2-я группа), ОК и ПЭГ-400/ОК (3-я группа). Смесь ПЭГ-400 и ОК была включена в обе группы 1 и 3.  $P < 0.05$  считали статистически значимым.

### **5.3. Результаты и обсуждение**

#### *5.3.1. Тестовое исследование на наночастицах диоксида титана*

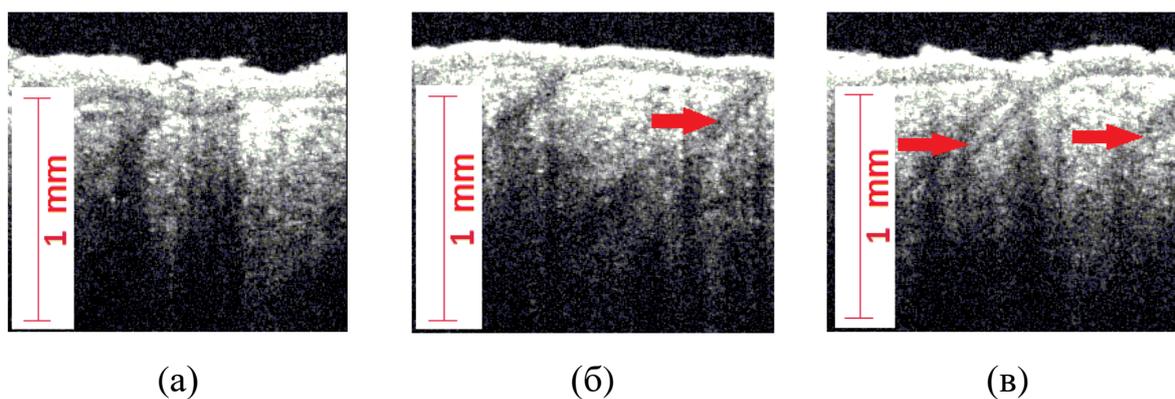
На рисунке 60 представлена зависимость оптической глубины детектирования наночастиц в фолликулах от времени сонофореза. Хорошо видно, что с увеличением времени УЗ облучения глубина проникновения наночастиц вглубь фолликулов увеличивается. Значительный разброс значений относительно среднего в каждый момент времени объясняется, на наш взгляд, различиями стадий развития волос на исследуемых участках у различных животных, при которых глубина залегания луковицы в коже значительно варьируется. Максимальная оптическая глубина проникновения данных частиц составила  $197 \pm 47$  мкм в течение 5 мин. В дальнейшем наблюдались незначительные колебания относительно данного значения, связанные с тем, что регистрация ОКТ-изображений производилась от различных участков в пределах области воздействия.



**Рисунок 60.** Зависимость оптической глубины детектирования ( $\delta$ ) частиц  $\text{TiO}_2$  в волосяных фолликулах крысы *ex vivo* от времени воздействия ультразвука.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными работ [224], [227], [288], [292]–[294], в которых показано, что воздействие УЗ с частотой 1-1.5 МГц способствует более глубокому внедрению лекарственных препаратов и наночастиц в биоткани. Для объяснения повышения проницаемости кожи под действием УЗ с различной частотой Polat и соавторы [227] предложили несколько кавитационных механизмов. Так, при частоте  $>0.7$  МГц микропузырьки образуются внутри кожи в волосяных фолликулах и полостях сальных желёз, при этом радиус пузырька составляет  $<2.7$  мкм. Разница давления при осцилляции пузырьков способствует проталкиванию суспензии наночастиц в фолликул. Использование более низкочастотного ультразвука вызывает усиленный кавитационный эффект, который приводит к разрушению микропузырьков, что усиливает движение окружающей жидкости, но может вызвать повреждение ткани. Кроме того, в процессе облучения на низких частотах наблюдается нагрев ткани, что также улучшает её проницаемость [295].

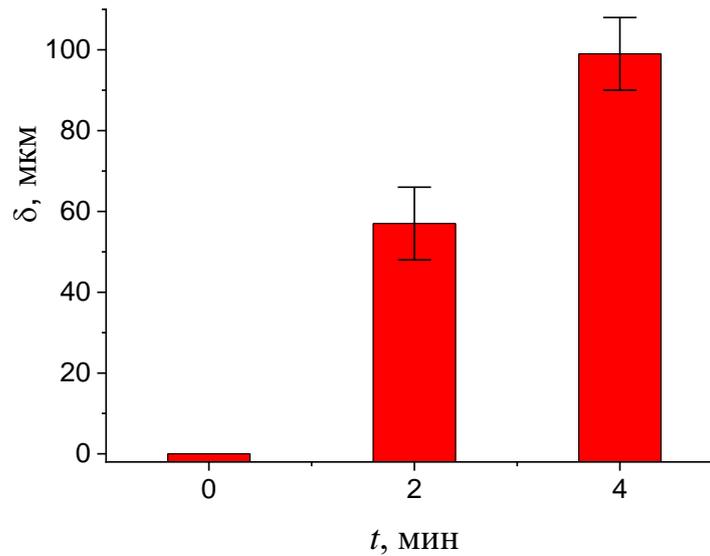
На рисунке 61 представлены сравнительные ОКТ-изображения исследуемых участков кожи *in vivo* до внедрения частиц, после нанесения суспензии  $\text{TiO}_2$  на основе ПЭГ-300 и УЗ обработки исследуемого участка (2 мин), а также после вторичного нанесения суспензии и повторной обработки исследуемого участка (2 мин). Таким образом, полное время облучения составляло 4 мин. На рисунке отчетливо видны фолликулы, заполненные суспензией частиц (отмечены стрелками).



**Рисунок 61.** ОКТ-изображения исследуемых участков кожи *in vivo* с фолликулами: (а) до внедрения суспензии наночастиц  $\text{TiO}_2$ ; (б) после нанесения суспензии и двухминутного УЗ воздействия; (в) после повторного нанесения суспензии и двухминутного УЗ воздействия. Стрелками обозначены участки, соответствующие волосяным фолликулам с локализованными внутри исследуемыми частицами.

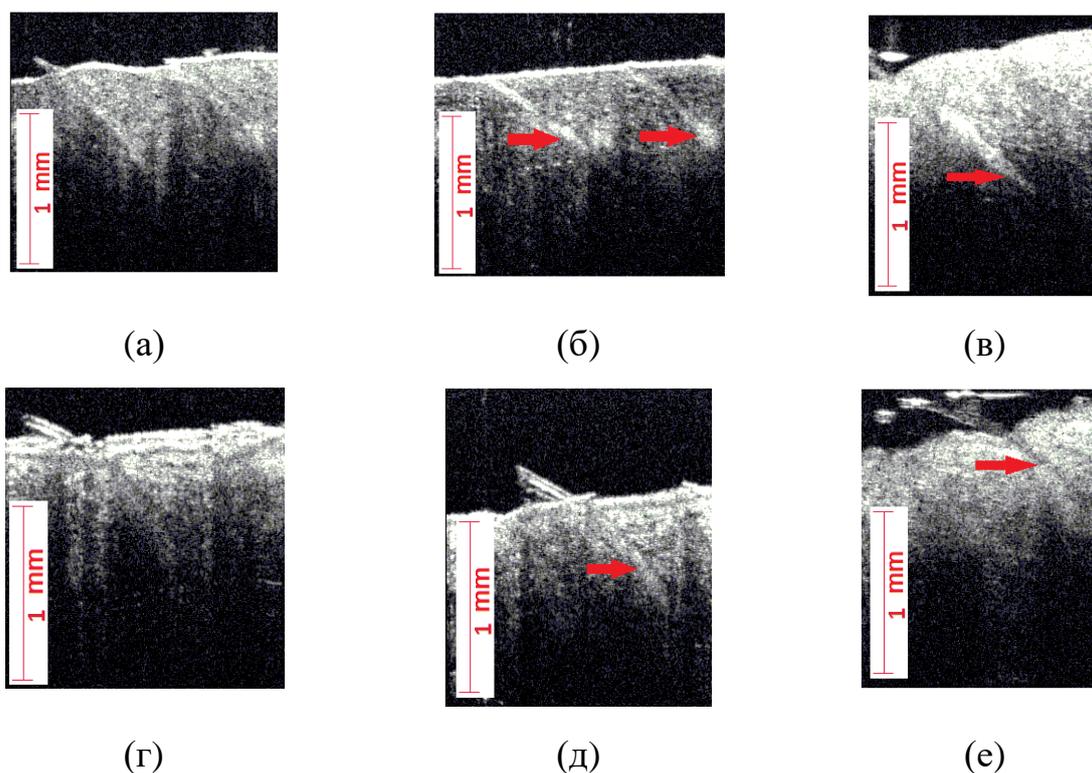
Анализ изображений показал, что средняя оптическая глубина детектирования частиц после двухминутного воздействия ультразвука составила  $57 \pm 9$  мкм, а после четырёхминутного –  $99 \pm 9$  мкм.

Сравнение оптической глубины детектирования наночастиц в коже с предыдущим экспериментом показало, что в *in vivo* исследованиях значения данного параметра приблизительно в 1.7 раза меньше, чем при аналогичном воздействии в *ex vivo* исследованиях. Результаты оценки представлены на рисунке 62. Данный результат может быть связан с небольшим оптическим просветлением кожи основой суспензии (ПЭГ-300), возникающем уже в процессе УЗ-воздействия. Оптическое просветление способствует увеличению глубины зондирования ОКТ [140], что позволяет визуализировать более глубокие участки фолликулов. При *ex vivo* исследованиях оптическое просветление более эффективно, т.к. отсутствует реакция организма, направленная на вымывание иммерсионного агента из области наблюдения и восстановление биохимического состава внутритканевой среды.



**Рисунок 62.** Временная зависимость оптической глубины детектирования ( $\delta$ ) частиц  $\text{TiO}_2$  в волосяных фолликулах крысы *in vivo* под действием ультразвука.

На рисунке 63 представлены две серии ОКТ-изображений исследуемых участков кожи крысы *ex vivo* при использовании в качестве оптических просветляющих агентов ПЭГ-400 и смеси ПЭГ-400 и ДМСО. ПЭГ-400 был выбран на основе данных работы [296], в которой было показано, что ПЭГ-400 является более эффективным агентом, чем ПЭГ-300. ДМСО использовался для увеличения проницаемости рогового слоя эпидермиса [38], [181], [293]. На рисунках (а) и (г) представлены изображения участков кожи с фолликулами до нанесения суспензии наночастиц, (б) и (д) – сразу после нанесения и УЗ воздействия в течение 1 мин, (в) и (е) - через 60 мин после нанесения на обработанную область иммерсионных просветляющих агентов.



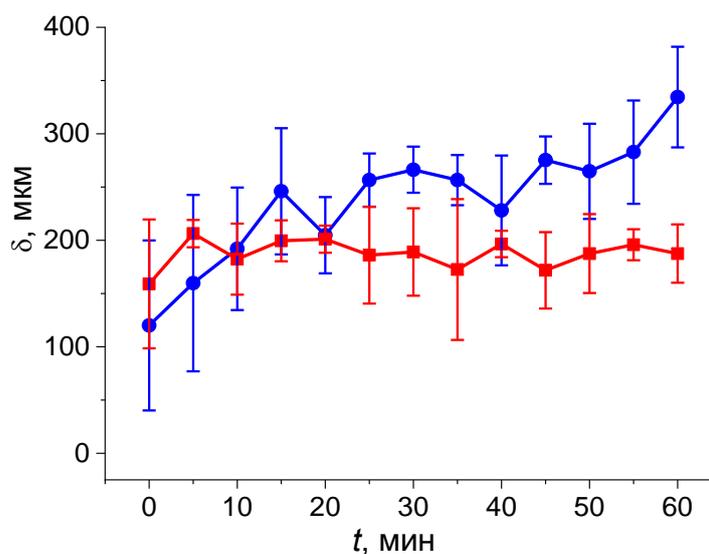
**Рисунок 63.** ОКТ-изображения исследуемых участков кожи крысы *ex vivo* при использовании в качестве иммерсионного просветляющего агента смесь ПЭГ-400 и ДМСО (80:20%) (а,б,в): (а) до внедрения суспензии наночастиц, (б) после УЗ внедрения частиц в течение 1 мин, (в) через 60 мин после нанесения агента; и при использовании в качестве иммерсионного просветляющего агента ПЭГ-400 (г,д,е): (г) до внедрения суспензии наночастиц, (д) после УЗ внедрения частиц в течение 1 мин, (е) через 60 мин после нанесения агента. Стрелками обозначены участки, соответствующие волосяным фолликулам с локализованными внутри исследуемыми частицами.

На рисунке 64 показаны средние значения оптической глубины детектирования частиц, измеренные в различные моменты времени. Значение глубины детектирования в начальный момент соответствует измерению непосредственно после внедрения наночастиц до нанесения иммерсионного агента. Сравнение рисунков 60 и 64 показывает, что использование ПЭГ-400 в качестве основы для приготовления суспензии наночастиц способствует визуализации наночастиц на большей глубине после минутного УЗ воздействия (в среднем для обеих групп более 130 мкм), чем ПЭГ-300 ( $62 \pm 28$  мкм), что может быть связано с более эффективным оптическим просветлением кожи уже в течение УЗ обработки. С течением времени воздействие двухкомпонентного иммерсионного агента (ПЭГ-400 и ДМСО) приводит к дальнейшему увеличению глубины зондирования, вследствие чего увеличивается и оптическая глубина детектирования частиц, локализованных в волосяных фолликулах. Среднее значение  $\delta$  при использовании смеси ПЭГ-400 и ДМСО увеличилось в течение 60 мин с  $120 \pm 80$  мкм до  $335 \pm 47$  мкм, т.е. в 2.8 раз.

Кинетика средней оптической глубины детектирования наночастиц при оптическом просветлении ткани с помощью ПЭГ-400 говорит о том, что использование ПЭГ-400 без

добавления ДМСО в течение всего времени наблюдения не способствует дополнительному увеличению оптической глубины детектирования наночастиц. Частицы хорошо визуализировались на глубине  $\leq 200$  мкм, что менее чем на 20% больше оптической глубины детектирования без оптического просветления кожи.

Влияние ДМСО на скорость и величину оптического просветления объясняется его способностью растворять липиды рогового слоя эпидермиса [297] и изменять межфибрилярное пространство коллагеновых волокон на субмикронном уровне [205]. Также, вероятно, имеет место быть увлечение потоком диффундирующего в кожу ДМСО наночастиц.



**Рисунок 64.** Кинетика средней оптической глубины детектирования наночастиц  $\text{TiO}_2$  в волосяных фолликулах крысы *ex vivo* при оптическом просветлении ткани с помощью ПЭГ-400 (■) и с помощью смеси ПЭГ-400 и ДМСО (80:20%) (●). Символы соответствуют экспериментальным данным. Вертикальные линии – стандартному отклонению.

Таким образом, результаты данного исследования показали, что применение двухкомпонентного иммерсионного агента (ПЭГ-400 и ДМСО) способствует лучшей визуализации объектов внутри ткани, по сравнению с ПЭГ-400, несмотря на близкие значения показателей преломления обоих препаратов. Также можно сделать вывод о том, что УЗ-воздействия в течение одной минуты достаточно для достижения максимальной глубины проникновения наночастиц в фолликулы.

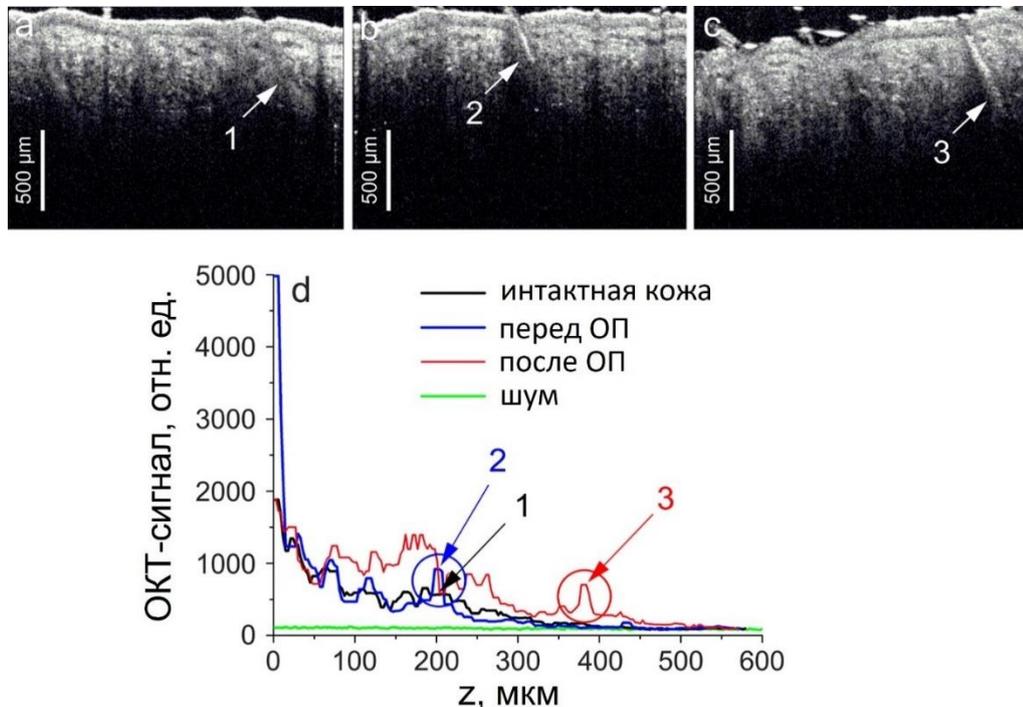
### 5.3.2. Эксперименты с субмикронными частицами карбоната кальция

#### 5.3.2.1. Исследование *ex vivo*

На рисунке 65 представлены ОКТ-изображения кожи крысы с волосяными фолликулами в разные промежутки времени: до обработки (интактная кожа), после УЗ-внедрения частиц с

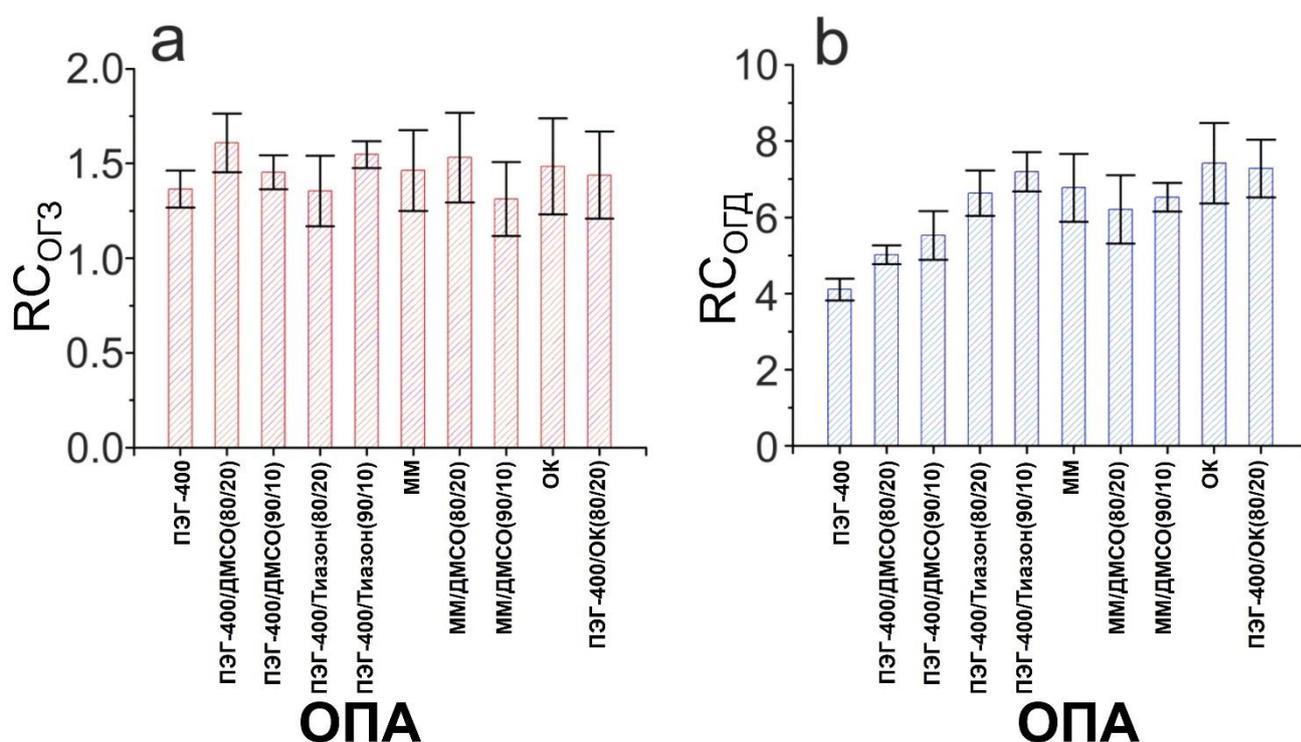
использованием этанола (до ОП) и после ОП с использованием смеси ММ/ДМСО в соотношении 90/10%.

На рисунке 65(a) отчетливо видно, что контраст пустых волосяных фолликулов в коже низок, так как внутри нет частиц (амплитуда сигнала в области «1», отмеченной стрелкой, составляет около 420 отн.ед.). При локализации частиц в области «2» внутри фолликула на глубине 206 мкм (рисунок 65(b)) контрастность фолликула на ОКТ-изображении увеличивается более чем в 2 раза (амплитуда сигнала около 890 отн. ед.) из-за различий в значениях показателя преломления карбоната кальция (1,6) [298] и дермы (1,4) [30]. Это хорошо согласуется с результатами, представленными в работе [299], в которой наночастицы золота и  $\text{TiO}_2$  использовались в качестве контрастных агентов для ОКТ-визуализации волос. На рисунке 66(d) хорошо видно, что в целом уровень ОКТ-сигнала после ОП увеличился. Таким образом, применение ОПА приводит к повышению оптической прозрачности окружающих тканей и, таким образом, к увеличению ОГД для частиц  $\text{CaCO}_3$  в фолликуле (рисунок 65(c)) примерно на 89% (383 мкм). Амплитуда сигнала на этой глубине (~600 отн.ед.) примерно в 3.5 раза выше, чем в окружающей дерме (~170 отн.ед.) и в 15 раз выше, чем в дерме до ОП (~40 отн.ед.). Кроме того, использование ОПА совместно с энхансерами, по-видимому, обеспечивает дополнительное улучшение проницаемости частиц  $\text{CaCO}_3$  вдоль фолликула за счет лучшего скольжения частиц.



**Рисунок 65.** ОКТ-изображения кожи крысы с волосяными фолликулами в разные промежутки времени: (a) неповрежденная кожа; кожа после УЗ-внедрения частиц  $\text{CaCO}_3$  с использованием (b) этанола и (c) раствора ММ/ДМСО, когда достигнуто максимальное значение ОГД частиц внутри фолликулов; (d) А-сканы областей, отмеченных на ОКТ-изображениях (a-c). Стрелки указывают на анализируемые фолликулы.

Гистограммы относительного изменения ОГЗ (а) и ОГД (б) для исследованных ОПА представлены на рисунке 66. Из рисунка 66(а) хорошо видно, что все ОПА обеспечивают эффективное увеличение ОГЗ. Статистический анализ показал недостоверность различий между значениями  $RC_{\text{ОГЗ}}$  при сравнении всех исследуемых групп. Однако результаты статистического анализа  $RC_{\text{ОГЗ}}$  в группе с ПЭГ-400 (1-я группа) показали достоверность различий ( $p < 0.05$ ). Этот результат хорошо согласуется с работами [36]–[38], [40], [296], [300], в которых была продемонстрирована высокая эффективность ПЭГ-400 в сочетании с ДМСО и Тиазоном при оптическом просветлении дермы. Незначительность различий средних значений  $RC_{\text{ОГЗ}}$  внутри обеих групп 2 и 3 может быть связана с отсутствием синергетического усиливающего эффекта при использовании липофильных ОПА.



**Рисунок 66.** Относительное изменение (а) ОГЗ (оптической глубины зондирования) и (б) ОГД (оптической глубины детектирования) для различных ОПА. Столбики погрешностей представляют собой стандартное отклонение среднего значения.

В отличие от  $RC_{\text{ОГЗ}}$ , по данным ANOVA, различия между значениями  $RC_{\text{ОГД}}$  во всех исследуемых группах статистически значимы ( $p < 0.05$ ). При этом результат раздельного анализа внутри групп 1-3 также показал значимость различий в значениях  $RC_{\text{ОГД}}$  для 1-й группы ( $p < 0.01$ ) и недостоверность различий для 2-й и 3-й групп ( $p > 0.05$ ).

Как видно из рисунка 66(б), применение чистого ПЭГ-400 и его смесей с ДМСО обеспечивает наименьшие значения  $RC_{\text{ОГД}}$ . В этих случаях дегидратация дермы ухудшила визуализацию фолликулов. Это может быть вызвано сморщиванием и уплотнением кожи, что

приводит к увеличению показателя преломления дермы и, как следствие, к снижению контраста визуализации заполненных частицами фолликулов относительно фона. ПЭГ-400 из-за своих гиперосмотических свойств вызвал наибольшую дегидратацию кожи и, следовательно, продемонстрировал наименьшее значение  $RC_{огд}$ .

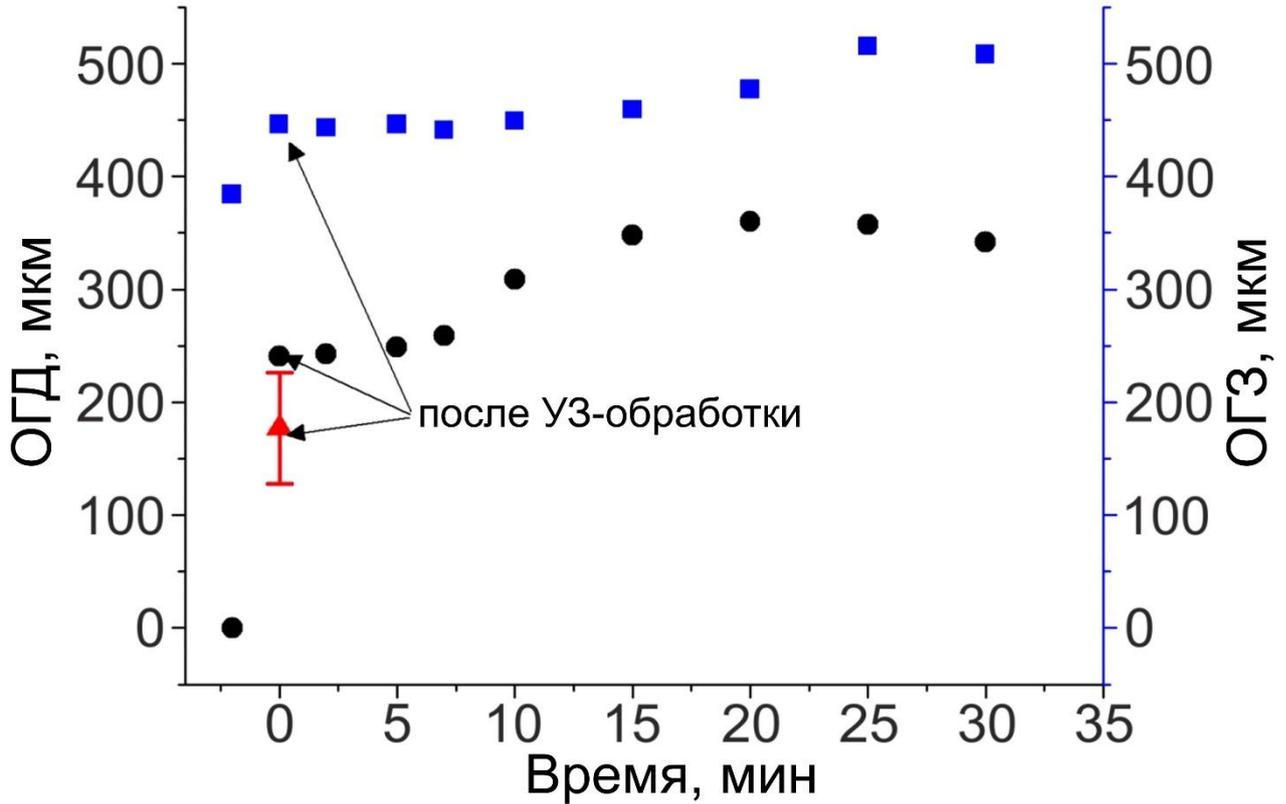
Гидрофобные ММ и ОК продемонстрировали значительное усиление  $RC_{огз}$  и  $RC_{огд}$ . Этот эффект связан с эффективным оптическим просветлением эпидермиса при дополнительном воздействии ультразвука. Преимуществом применения ММ и ОК является отсутствие обезвоживания кожи, которое наблюдалось при применении гиперосмотических ОПА.

Высокие значения  $RC_{огз}$  и  $RC_{огд}$  также были достигнуты при использовании смеси ПЭГ-400/ОК, что хорошо согласуется с результатами, представленными в [39]. В такой смеси ОК играет роль усилителя проницаемости и воздействует на кожу, нарушая организацию липидов рогового слоя, повышая их текучесть.

Кроме того, комбинация УЗ-ПЭГ-400/ОК позволила достичь максимального значения  $RC_{огз}$  и  $RC_{огд}$  непосредственно во время обработки ультразвуком (т.е. в течение 2 мин); для сравнения, использование УЗ-ОК дало аналогичные результаты в течение часа после обработки ультразвуком. Таким образом, можно сделать вывод, что комбинация ПЭГ-400/ОК в соотношении 80/20% с 2-минутной обработкой ультразвуком обеспечивает оптимальное увеличение  $RC_{огз}$  и  $RC_{огд}$  по соотношению время/эффект.

#### 5.3.2.2. Исследование *in vivo*

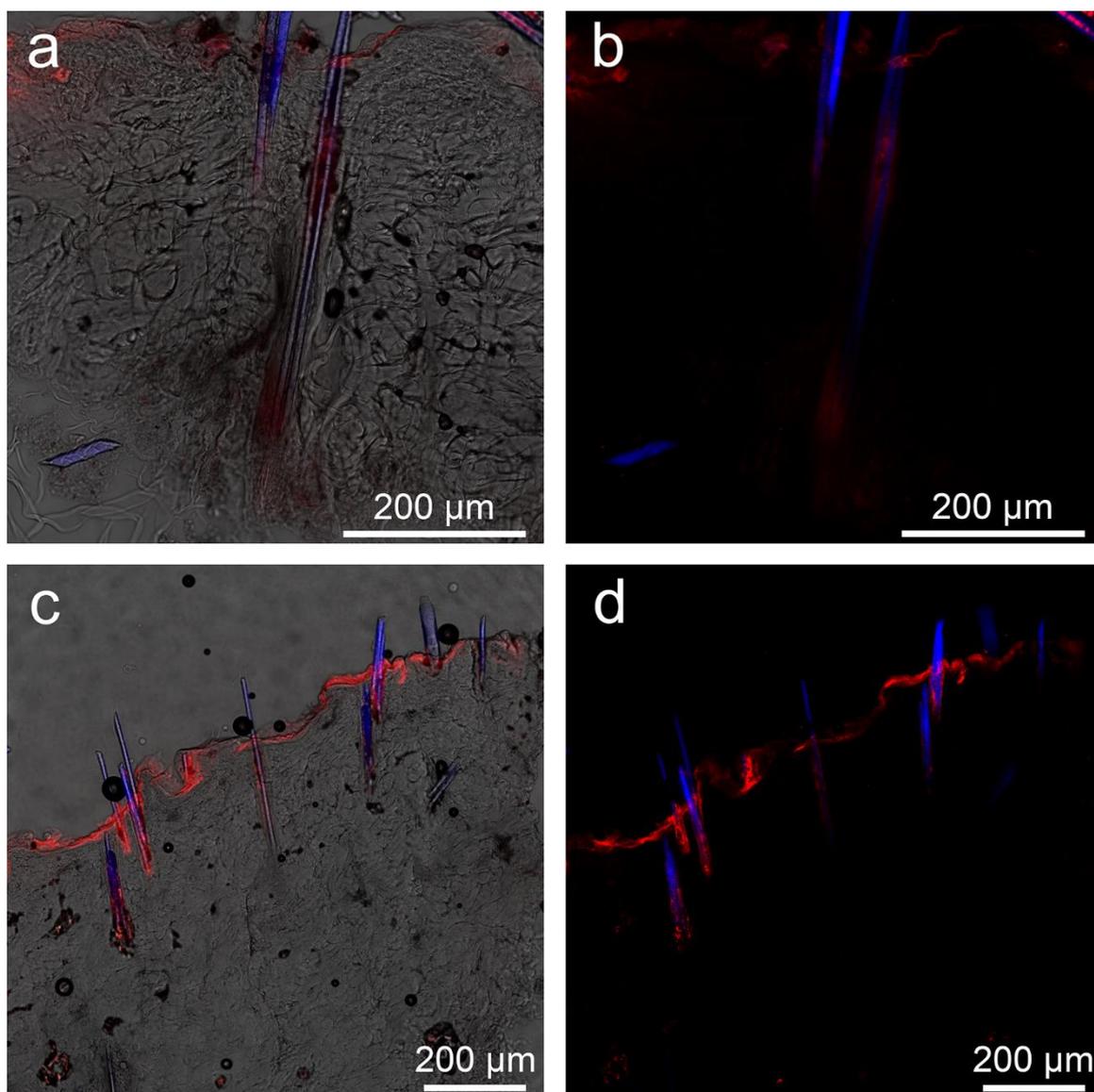
Для тестирования *in vivo* была выбрана смесь ПЭГ-400/ОК. Кинетика ОГЗ и ОГД представлена на рисунке 67. ОГД при отсутствии частиц внутри фолликулов равен 0. Она достигла величины 240 мкм после внедрения частиц с помощью УЗ и увеличилась в 1.5 раза при ОП. ОГЗ также увеличилась более чем в 1.3 раза по сравнению с интактной кожей.



**Рисунок 67.** Кинетика ОГД (оптическая глубина детектирования - черные кружки) и ОГЗ (оптическая глубина зондирования - синие квадраты) при оптическом просветлении раствором ПЭГ-400/ОК (80/20); красный треугольник со столбцом разброса представляет собой ОГД, когда частицы были внедрены в кожу с использованием этанола во время обработки ультразвуком. Первая временная точка соответствует начальным измерениям (до обработки ультразвуком), «0 мин» соответствует моменту сразу после 2-минутной обработки ультразвуком.

Сравнение ОГД в области применения ОПА с областью, где применялся этанол, в момент времени  $t = 0$  позволяет сделать вывод, что использование ОПА также обеспечивает более глубокую доставку частицы в фолликулы.

С участка, обработанного раствором ПЭГ-400/ОК, были взяты биоптаты кожи для оценки реальной глубины проникновения частиц  $\text{CaCO}_3$ ; КЛСМ-изображения биопсий представлены на рисунке 68.



**Рисунок 68.** Изображения биоптатов кожи, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, после внедрения с помощью УЗ частиц  $\text{CaCO}_3$ , нагруженных  $\text{Cu7}$ , в волосяные фолликулы крысы *in vivo* с использованием ПЭГ-400/ОК во время обработки ультразвуком и ОП. Синий сигнал флуоресценции соответствует аутофлуоресценции волосяных стержней, а красный сигнал указывает на распределение  $\text{Cu7}$ . Изображения (a, b) и (c, d) представляют собой два разных 30-мкм среза замороженной кожи крысы, содержащих волосяные фолликулы: (a, c) – наложение просвечивающих и флуоресцентных изображений, (b, d) – флуоресцентных изображений.

На рисунке 68 (a-d) показано внутрифолликулярное распределение красителя  $\text{Cu7}$  по длине волосяных фолликулов. Флуоресцентный сигнал зарегистрирован на глубинах 300–500 мкм. Таким образом, измеряя реальную глубину проникновения частиц, мы обнаружили, что носители  $\text{CaCO}_3$  размером  $0.8 \pm 0.3$  мкм в диаметре проникают по волосяному фолликулу на глубину до 500 мкм при совместном применении с раствором ПЭГ-400/ОК. Такие результаты хорошо согласуются с литературными данными, демонстрирующими трансфолликулярное проникновение различных частиц аналогичного размера. Так, глубина проникновения PGLA-частиц  $\sim 860$  нм в свиную кожу при применении *in vitro* составила  $\sim 600$  мкм [301].

Полистироловые микросферы размером  $\sim 0.75$  мкм проникли в волосяные фолликулы человека *in vitro* на глубину 200-499 мкм [302].

В настоящее время недостаточно информации о трансфолликулярной доставке *in vivo* для частиц с размерами, аналогичными использованным в нашем исследовании. Однако есть некоторые результаты, демонстрирующие трансфолликулярное проникновение частиц иного размера. Наночастицы золота диаметром  $\sim 135$  нм, которые используются в терапии обыкновенных угрей, и 150 нм наносили на поврежденную и здоровую кожу добровольцев [299], [303]. Средняя глубина их проникновения в фолликулы достигла 300 мкм после ручного массажа [303] или 1.2 мм после вибрационного массажа [299]. В другой работе были исследованы наноэмульсии с различными размерами частиц, включающие краситель Р4 и Кумарин 6 в качестве груза [304]. 80-нм эмульсии проникли внутрь кожи по ходу волосяного фолликула на глубину 588 мкм, а 500-нм эмульсии были обнаружены в корне волосяного фолликула через 48 часов после нанесения наноэмульсии.

Таким образом, улучшенное оптическое просветление с использованием ПЭГ-400/ОК и обработки ультразвуком позволяет обеспечить эффективное проникновение субмикронных частиц в волосяные фолликулы кожи крысы, а также неинвазивное определение фолликулярного наполнения и хранения частиц.

#### 5.4. Выводы

В результате эксперимента по исследованию внедрения наночастиц  $\text{TiO}_2$  диаметром  $\sim 25$  нм в кожу по каналу волосяного фолликула получено, что при использовании сонофореза с частотой 1 МГц и мощностью облучения 1 Вт в течение 1 мин фолликулы полностью заполняются суспензией наночастиц, однако для детектирования оптической глубины их локализации в фолликуле с помощью ОКТ, необходимо дополнительно применять оптическое иммерсионное просветление кожи. При использовании в качестве иммерсионного агента смесь ПЭГ-400 и ДМСО (в соотношении 80:20%) получено, что оптическая глубина детектирования частиц в фолликулах увеличилась в течение 60 мин в 2.8 раз. В контрольном эксперименте с применением только ПЭГ-400 максимальная глубина детектирования наночастиц увеличилась только на 20%. Таким образом, добавление ДМСО способствует дополнительному увеличению средней глубины детектирования наночастиц в коже.

В результате эксперимента по исследованию оптической глубины зондирования кожи и оптической глубины детектирования частиц  $\text{CaCO}_3$  внутри волосяных фолликулов с использованием различных ОПА отдельно и в сочетании с усилителями проницаемости кожи получено, что дегидратация кожи под действием гиперосмотических оптических просветляющих агентов приводит к ухудшению контрастности ОКТ-изображения частиц и

снижению ОГД. Между тем, применение липофильных ОПА (минеральное масло и олеиновая кислота) позволяет эффективно просветлять эпидермис при отсутствии дегидратации кожи, обеспечивая высокие значения как ОГЗ (увеличение в ~1.5 раза после ОП), так и ОГД (увеличение в ~7 раз после ОП). Кроме того, комбинация ПЭГ-400/ОК в соотношении 80/20% обеспечила наилучший эффект ОП в плане соотношения время/эффект, показав увеличение  $RC_{ОГЗ}$  и  $RC_{ОГД}$  в ~1.4 и ~7 раз, соответственно, сразу после 2-минутной обработки ультразвуком. В *in vivo* измерениях те же параметры показали увеличение 1.3 и более чем в 1.5 раза, соответственно, по сравнению с интактной кожей.

Результаты, опубликованные в главе, предствлены в следующих работах:

1. **Sergey M. Zaytsev**, Yulia I. Svenskaya, Ekaterina V. Lengert, Georgy S. Terentyuk, Alexey N. Bashkatov, Valery V. Tuchin, Elina A. Genina, (2020) Optimized skin optical clearing for optical coherence tomography monitoring of encapsulated drug delivery through the hair follicles, *Journal of Biophotonics*, 2020, 13 (4), e201960020. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960020>
2. **С. М. Зайцев**, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина, (2018) Оптическое просветление как способ увеличения глубины детектирования наночастиц в коже при ОКТ-визуализации, *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика* 18(4), 275-284, DOI: 10.18500/1817-3020-2018-18-4-275-284.
3. **С. М. Зайцев**, Ю. И. Свенская, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин, Э. А. Генина, (2018) Оценка эффективности оптических просветляющих агентов при детектировании наноконтейнеров в коже с помощью ОКТ, Материалы пятой Всероссийской научной школы-семинара «Взаимодействие Сверхвысокочастотного, Терагерцового и Оптического Излучения с Полупроводниковыми Микро- и Наноструктурами, Метаматериалами и Биообъектами 2018», с. 90-92.
4. Ю. И. Свенская, Э. А. Генина, О. И. Гусякова, Б. В. Парахонский, Д. А. Горин, Г. Б. Сухоруков, В. В. Тучин, **С. М. Зайцев**, А. Н. Башкатов, Е. Е. Тальникова, А. Б. Бучарская, Г. С. Терентюк, С. Р. Утц, Способ трансдермальной доставки биологически активных веществ / Патент № 2633928, 19 Октября 2017 г.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, представленные в работе, заключаются в следующем:

1. Исследовано влияние оптического просветления гибридной двухслойной модели, состоящей из кожи человека *ex vivo* и флуоресцентного геля, на эффективность измерений методом бимодальной спектроскопии с пространственным разрешением. Гибридная конфигурация исследуемых образцов позволила производить анализ спектрального вклада различных флуорофоров, расположенных на разных глубинах и его кинетику в процессе просветления. Получено, что поверхностное нанесение на кожу двух комбинаций ОПА и химических усилителей проницаемости приводит к увеличению сигнала флуоресценции и диффузного отражения, регистрируемого от слоя флуоресцентного геля из-под кожи. В то же время, сниженное рассеяние кожи под воздействием ОПА вызывает снижение интенсивности спектров автофлуоресценции. Таким образом, подтверждается эффективность методики оптического просветления для улучшения диагностического потенциала по глубине метода мультимодальной спектроскопии.
2. Было экспериментально продемонстрировано, что улучшение амплитуды сигнала по глубине метода мультимодальной спектроскопии связано не только с воздействием ОПА. Эффект, схожий с эффектом оптического просветления полученный без применения ОПА в «сухих» условиях позволил подтвердить влияние давления, оказываемого спектральным зондом на кожу, на результаты спектральных измерений.
3. Уменьшение толщины *ex vivo* кожи при естественной дегидратации также вносит вклад в усиление спектрального сигнала, регистрируемого от глубоко расположенных слоёв биоткани.
4. Экспериментально исследована методом конфокальной ОКТ с линейным полем эффективность оптического просветления кожи человека *in vivo* биосовместимыми концентрациями ОПА и энхансеров в сочетании с физическими методами повышения проницаемости кожи. Путём анализа средней интенсивности и контраста ОКТ-изображений продемонстрирована эффективность по глубине биосовместимого оптического просветления *in vivo*. Получено, что наилучшее увеличение интенсивности и контраста ОКТ-изображений по глубине (40 %) после 10 минут УЗ-просветления было достигнуто при использовании смеси ПЭГ/ОК/ПГ. Результаты аппроксимации экспериментальных данных гипотетической моделью двухфазной экспоненциальной ассоциации хорошо соответствуют экспериментальным результатам.

5. Исследовано влияние оптического просветления биосовместимыми смесями ОПА и энхансеров, в сочетании с физическими методами усиления проницаемости кожи, модельной меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo* на результаты измерений методом спектроскопии диффузного отражения. Получено, что наклон кривой диффузного отражения в диапазоне 470-520 нм после просветления смесью Глюкоза/ОК/ПГ относительно интактной кожи *in vivo* снизился на 55%, позволив наиболее точно численно дифференцировать участок расположения меланомы. В спектральном диапазоне 650–800 нм на *in vivo* этапе не было продемонстрировано ощутимого просветляющего воздействия смесями ОПА+энхансер на наклон спектральной кривой. Однако, измерения, произведённые в условиях *ex vivo*, продемонстрировали эффект просветления почти всеми смесями ОПА. Наилучшие результаты увеличения наклона (70%) после просветления участков кожи с меланомой продемонстрировала смесь Глюкоза/ОК/ПГ. Все смеси ОПА в разной степени после просветления продемонстрировали увеличение различий в сигнале диффузного отражения от трёх пиков поглощения крови между участками кожи с меланомой и здоровой кожей. Лучший эффект оптического просветления был достигнут на *ex vivo* этапе эксперимента смесью Глюкоза/ОК/ПГ. На длинах волн 420 нм, 545 нм и 575 нм относительные изменения соотношения  $R_{\text{benign}}/R_{\text{melanoma}}$  после просветления составили 314 %, 205 % и 204 %, соответственно. Таким образом, была экспериментально показана возможность биосовместимого оптического просветления меланомы кожи мыши *in vivo* и *ex vivo* смесями ОПА с клинически допустимыми концентрациями.
6. Исследовано внедрение наночастиц  $\text{TiO}_2$  диаметром  $\sim 25$  нм в кожу крысы по каналу волосяного фолликула. Получено, что при использовании сонофореза с частотой 1 МГц и мощностью облучения 1 Вт в течение 1 мин фолликулы полностью заполняются суспензией наночастиц, однако для детектирования оптической глубины их локализации в фолликуле с помощью ОКТ, необходимо дополнительно применять оптическое иммерсионное просветление кожи. При использовании в качестве иммерсионного агента смесь ПЭГ-400 и ДМСО (в соотношении 80:20%) получено, что оптическая глубина детектирования частиц в фолликулах увеличилась в течение 60 мин в 2.8 раз. Таким образом, ОП способствует дополнительному увеличению средней глубины детектирования наночастиц в коже.
7. Исследовано влияние оптического просветления на изменение оптической глубины зондирования кожи и оптической глубины детектирования субмикронных частиц  $\text{CaCO}_3$  внутри волосяных фолликулов. Получено, что комбинация ПЭГ-400/ОК в соотношении 80/20% обеспечила наилучший эффект оптического просветления *ex vivo* в плане

соотношения время/эффект, показав увеличение оптической глубины зондирования и оптической глубины детектирования в  $\sim 1.4$  и  $\sim 7$  раз, соответственно, сразу после 2-минутной обработки ультразвуком. В *in vivo* измерениях те же параметры показали увеличение 1.3 и более чем в 1.5 раза, соответственно, по сравнению с интактной кожей.

Полученные результаты способствуют развитию метода оптической диагностики кожи в направлении уточнения существующих и развития новых методик оптического просветления при оптической диагностике и терапии патологических образований кожи, смещая фокус исследований с теоретических экспериментальных исследований на потенциальную практическую имплементацию оптического просветления в клинических условиях. Полученные результаты имеют практическую значимость, поскольку способствуют развитию направления в медицине, связанного с повышением эффективности и безопасности диагностики и терапии патологических изменений кожи.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

За помощь в исследованиях и обсуждении результатов выражается аспирантам СГУ имени Н.Г. Чернышевского Ю. И. Суркову, И. А. Серебряковой и Н. А. Шушуновой, старшему научному сотруднику лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» НМЦ СГУ имени Н.Г. Чернышевского к.ф.-м.н. Ю. И. Свенской, руководителю коллективного центра НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского д.б.н. А.Б. Бучарской, заведующему кафедрой оптики и биофотоники СГУ имени Н.Г. Чернышевского д.ф.-м.н. В. В. Тучину, а также сотрудникам кафедры оптики и биофотоники, высказавшим полезные советы и замечания.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] “What Are Basal and Squamous Cell Skin Cancers? | Types of Skin Cancer”, *Cancer.org*, Retrieved 13 February 2023, <https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/about/what-is-basal-and-squamous-cell.html>.
- [2] А. В. Приезжев, В. В. Тучин, Л. П. Шубочкин, *Лазерная диагностика в биологии и медицине*, М.: Наука (1989), 240 с.
- [3] В. В. Тучин, *Оптическая биомедицинская диагностика в 2 т.*, М.: ФИЗМАТЛИТ (2007).
- [4] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook: Biomedical Diagnostics*, 2<sup>nd</sup> ed., Routledge & CRC Press, Boca Raton (2019).
- [5] L. V. Wang, H. Wu, *Biomedical Optics: Principles and Imaging*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (2007).
- [6] D. A. Boas, C. Pitris, and N. Ramanujam, *Handbook of Biomedical Optics*, 1<sup>st</sup> ed., CRC Press, Boca Raton (2011).
- [7] V. V. Tuchin, J. Popp, and V. Zakharov, *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*, 1<sup>st</sup> ed., Springer, Cham (2020).
- [8] H. J. C. M. Sterenborg, M. Motamedi, R. F. Wagner, M. Duvic, S. Thomsen, and S. L. Jacques, “In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours”, *Laser. Med. Sci.* **9**(3), 191–201 (1994).
- [9] Y. P. Sinichkin, S. R. Utz, A. H. Mavliutov, and H. A. Pilipenko, “In vivo fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models”, *JBO* **3**(2), 201–212 (1998).
- [10] J. B. Dawson, D. J. Barker, D. J. Ellis, E. Grassam, J. A. Cotterill, G. W. Fisher, and J. W. Feather, “A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin”, *Phys. Med. Biol.* **25**(4), 695–709 (1980).
- [11] S. L. Jacques, “The Role of Skin Optics in Diagnostic and Therapeutic Uses of Lasers”, in *Lasers in Dermatology*, Berlin, Heidelberg, 1–21 (1991).
- [12] W. Verkruyse, R. Zhang, B. Choi, G. Lucassen, L. O. Svaasand, and J. S. Nelson, “A library based fitting method for visual reflectance spectroscopy of human skin”, *Phys. Med. Biol.* **50**(1), 57–70 (2005).
- [13] E. Zherebtsov, V. Dremin, A. Popov, A. Doronin, D. Kurakina, M. Kirillin, I. Meglinski, A. Bykov, “Hyperspectral imaging of human skin aided by artificial neural networks”, *Biomed. Opt. Express* **10**(7), 3545–3559 (2019).
- [14] C. Reble, I. Gersonde, S. Schanzer, M. C. Meinke, J. Helfmann, and J. Lademann, “Evaluation of detection distance-dependent reflectance spectroscopy for the determination of the sun protection factor using pig ear skin”, *J. Biophotonics* **11**(1), e201600257 (2018).
- [15] H. Hou, M. Dong, Y. Wang, L. Shu, Z. Ma, and Y. Liu, “Rapid and Noninvasive Detection of Skin Cholesterol with Diffuse Reflectance Spectroscopy Technology”, *Spectrosc. Spect. Anal.* **36**(10), 3215–3221 (2016).
- [16] Y. Zhang, A. J. Moy, X. Feng, H. T. M. Nguyen, K. R. Sebastian, J. S. Reichenberg, M. K. Markey, and J. W. Tunnell, “Diffuse reflectance spectroscopy as a potential method for nonmelanoma skin cancer margin assessment”, *Translational Biophotonics* **2**(3), e202000001 (2020).
- [17] E. Borisova, D. Ivanov, B. Kolev, T. Genova, V. Mircheva, S. Ilyov, L. Zaharieva, I. Lihachova, A. Lihachovs, J. Spigulis, and P. Troyanova, “Autofluorescence spectroscopy of

- cutaneous neoplasia under ultraviolet, visible and near infrared excitation”, in *Tissue Optics and Photonics* **11363**, 113630Z (2020).
- [18] E. G. Borisova, I. A. Bratchenko, Y. A. Khristoforova, L. A. Bratchenko, T. I. Genova, A. I. Gisbrecht, A. A. Moryatov, S. V. Kozlov, P. P. Troyanova, and V. P. Zakharov, “Near-infrared autofluorescence spectroscopy of pigmented benign and malignant skin lesions”, *Opt. Eng.* **59**(6), 061616 (2020).
- [19] E. Borisova, T. Genova-Hristova, P. Troyanova, I. Terziev, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, O. Semyachkina-Glushkovskaya, V. V. Tuchin, and L. Avramov, “Optical UV-VIS-NIR spectroscopy of benign, dysplastic and malignant cutaneous lesions ex vivo”, in *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI* **10685**, 106853T (2018).
- [20] L. Lim, B. Nichols, M. R. Migden, N. Rajaram, J. S. Reichenberg, M. K. Markey, M. I. Ross, and J. W. Tunnell, “Clinical study of noninvasive in vivo melanoma and nonmelanoma skin cancers using multimodal spectral diagnosis”, *JBO* **19**(11), 117003 (2014).
- [21] M. Amouroux, G. Díaz-Ayil, W. C. P. M. Blondel, G. Bourg-Heckly, A. Leroux, and F. Guillemain, “Classification of ultraviolet irradiated mouse skin histological stages by bimodal spectroscopy: multiple excitation autofluorescence and diffuse reflectance”, *JBO* **14**(1), 014011 (2009).
- [22] V. Narayanamurthy, P. Padmapriya, A. Noorasafin, B. Pooja, K. Hema, A. Khan, K. Nithyakalyani, and F. Samsuri, “Skin cancer detection using non-invasive techniques”, *RSC Adv.*, **8**(49), 28095–28130 (2018).
- [23] F. Abdat, M. Amouroux, Y. Guerneur, and W. Blondel, “Hybrid feature selection and SVM-based classification for mouse skin precancerous stages diagnosis from bimodal spectroscopy”, *Opt. Express* **20**(1), 228–244 (2012).
- [24] S. K. Chang, Y. N. Mirabal, E. N. Atkinson, D. Cox, A. Malpica, M. Follen, and R. Richards-Kortum, “Combined reflectance and fluorescence spectroscopy for in vivo detection of cervical pre-cancer”, *JBO* **10**(2), 024031 (2005).
- [25] R. A. Schwarz, W. Gao, D. Daye, M. D. Williams, R. Richards-Kortum, and A. M. Gillenwater, “Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy of oral epithelial tissue using a depth-sensitive fiber-optic probe”, *Appl. Opt.*, **47**(6), 825–834 (2008).
- [26] V. V. Tuchin, J. P. Culver, C. Cheung, S. A. Tatarkova, M. A. DellaVecchia, D. A. Zimnyakov, A. A. Chausky, A. G. Yodh, and B. Chance, “Refractive index matching of tissue components as a new technology for correlation and diffusing-photon spectroscopy and imaging”, in *Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications III* **3598**, 111–120 (1999).
- [27] M. Niwayama, “Voxel-based measurement sensitivity of spatially resolved near-infrared spectroscopy in layered tissues”, *JBO* **23**(3), 1–4 (2018).
- [28] M. C. Meinke, S. B. Lohan, W. Köcher, B. Magnussen, M. E. Darwin, and J. Lademann, “Multiple spatially resolved reflection spectroscopy to monitor cutaneous carotenoids during supplementation of fruit and vegetable extracts in vivo”, *Skin. Res. Technol.* **23**(4), 459–462 (2017).
- [29] Z. Kovacsova, G. Bale, S. Mitra, I. de Roeber, J. Meek, N. Robertson, and I. Tachtsidis, “Investigation of Confounding Factors in Measuring Tissue Saturation with NIRS Spatially Resolved Spectroscopy”, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1072**, 307–312 (2018).
- [30] V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, 3<sup>rd</sup> ed., SPIE Press, Bellingham (2015).

- [31] D. A. Boas, “A fundamental limitation of linearized algorithms for diffuse optical tomography”, *Opt. Express* **1**(13), 404–413 (1997).
- [32] A. Yu. Sdobnov, M. E. Darvin, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, J. Lademann, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **197**, 216–229 (2018).
- [33] D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing”, *Laser. Photon. Rev.* **7**(5), 732–757 (2013).
- [34] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Tissue optical immersion clearing”, *Expert Rev. Med. Devices* **7**(6), 825–842 (2010).
- [35] V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, 1<sup>st</sup> ed., Routledge & CRC Press, Boca Raton (2022).
- [36] Z. Zhi, Z. Han, Q. Luo, and D. Zhu, “Improve optical clearing of skin in vitro with propylene glycol as a penetration enhancer”, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **2**(3), 269–278 (2009).
- [37] Y. Liu, X. Yang, D. Zhu, R. Shi, and Q. Luo, “Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime”, *Opt. Lett.* **38**(20), 4236–4239 (2013).
- [38] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, E. A. Kolesnikova, M. V. Basko, G. S. Terentyuk, and V. V. Tuchin, “Optical coherence tomography monitoring of enhanced skin optical clearing in rats in vivo”, *JBO* **19**(2), 021109 (2013).
- [39] J. Jiang and R. K. Wang, “How different molarities of oleic acid as enhancer exert its effect on optical clearing of skin tissue in vitro”, *J. X-Ray Sci. Technol.* **13**(3), 149–159 (2005).
- [40] J. Wang, R. Shi, and D. Zhu, “Switchable skin window induced by optical clearing method for dermal blood flow imaging”, *JBO* **18**(6), 061209 (2012).
- [41] V. V. Tuchin, “Tissue Optics and Photonics: Light-Tissue Interaction”, *JBPE* **1**(2), 98-134 (2015).
- [42] T. B. Fitzpatrick, *Dermatology in general medicine*, McGraw-Hill Book Co., New York (1993).
- [43] L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, “Optical Clearing and Tissue Imaging”, in *The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering*, L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, Eds., 107–138, Springer, Cham (2019).
- [44] A. Bashkatov, E. Genina, and V. Tuchin, “Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: A review”, *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **4**(1), 9-38 (2011).
- [45] S. L. Jacques, “Optical properties of biological tissues: a review”, *Phys. Med. Biol.* **58**(11), R37-61 (2013).
- [46] R. Yang, T. Wei, H. Goldberg, W. Wang, K. Cullion, and D. S. Kohane, “Getting Drugs Across Biological Barriers”, *Adv. Mater.* **29**(37), 1606596 (2017).
- [47] V. V. Tuchin, “Tissue Optics and Photonics: Biological Tissue Structures”, *JBPE* **1**(1), 3-21 (2015).
- [48] “Epidermis”, *Wikipedia*, Retrieved 16 December 2021, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Epidermis&oldid=1054898144>
- [49] M. Heisig, R. Lieckfeldt, G. Wittum, G. Mazurkevich, and G. Lee, “Non steady-state descriptions of drug permeation through stratum corneum. I. The biphasic brick-and-mortar model”, *Pharm. Res.* **13**(3), 421–426 (1996).
- [50] V. V. Tuchin, *Lasers and Fiber Optics in Biomedical Science*, 2nd ed., Saratov University Press, Saratov (2010).

- [51] R. F. Reinoso, B. A. Telfer, and M. Rowland, “Tissue water content in rats measured by desiccation”, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **38**(2), 87–92 (1997).
- [52] L. M. Oliveira, A. L. V. S. Lage, M. P. P. Clemente, and V. V. Tuchin, “Rat muscle opacity decrease due to the osmosis of a simple mixture”, *JBO* **15**(5), 055004 (2010).
- [53] G. J. Tearney, M. E. Brezinski, J. F. Southern, B. E. Bouma, M. R. Hee, and J. G. Fujimoto, “Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography”, *Opt. Lett.* **20**(21), 2258–2260 (1995).
- [54] M. Sand, T. Gambichler, G. Moussa, F. G. Bechara, D. Sand, P. Altmeyer, and K. Hoffmann, “Evaluation of the epidermal refractive index measured by optical coherence tomography”, *Skin. Res. Technol.* **12**(2), 114–118 (2006).
- [55] H. Schaefer and T. E. Redelmeier, *Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption*, 1<sup>st</sup> ed., S. Karger, Basel (1996).
- [56] T. L. Troy and S. N. Thennadil, “Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm”, *JBO* **6**(2), 167–176 (2001).
- [57] S. L. Jacques, “Optical assessment of cutaneous blood volume depends on the vessel size distribution: a computer simulation study”, *J. Biophotonics* **3**(1–2), 75–81 (2010).
- [58] L. A. Goldsmith, *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford (1991).
- [59] J. Marks and J. Miller, *Lookingbill and Marks’ Principles of Dermatology*, 6<sup>th</sup> ed., Elsevier, Amsterdam (2017).
- [60] E. Claridge, S. Cotton, P. Hall, and M. Moncrieff, “From colour to tissue histology: Physics-based interpretation of images of pigmented skin lesions”, *Med. Image Anal.* **7**(4), 489–502 (2003).
- [61] C. S. Sinnatamby, *Last’s Anatomy: Regional and Applied*, 12<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, London (2011).
- [62] Blausen.com staff, “Medical gallery of Blausen Medical 2014”, *WikiJournal of Medicine* **1**(2), 2014.
- [63] W. E. Allen, “Terminologia anatomica: international anatomical terminology and Terminologia Histologica: International Terms for Human Cytology and Histology”, *J. Anat.* **215**(2), 221 (2009).
- [64] A. Bykov, V. Tuchin, and I. Meglinski, “Multiplexed spatially-focused localization of light in adipose biological tissues”, *Sci. Rep.* **12**, 9711 (2022).
- [65] E. V. Salomatina, B. Jiang, J. Novak, and A. N. Yaroslavsky, “Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range”, *JBO* **11**(6), 064026 (2006).
- [66] G. Muller, *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*, SPIE Press, Bellingham (1995).
- [67] F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor, and R. J. Ference, “Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method”, *Appl. Opt.* **28**(12), 2297–2303 (1989).
- [68] Y. Zhou, J. Yao, and L. V. Wang, “Tutorial on photoacoustic tomography”, *JBO* **21**(6), 061007 (2016).
- [69] R. L. P. van Veen, H. J. C. M. Sterenborg, A. Pifferi, A. Torricelli, E. Chikoidze, and R. Cubeddu, “Determination of visible near-IR absorption coefficients of mammalian fat using time- and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy”, *JBO* **10**(5), 054004 (2005).

- [70] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, A. A. Gavrilova, S. V. Kapralov, V. A. Grishaev, V. V. Tuchin, “Optical properties of human stomach mucosa in the spectral range from 400 to 2000nm: Prognosis for gastroenterology”, *Medical Laser Application* **22**(2), 95–104 (2007).
- [71] I. Yariv, G. Rahamim, E. Shlisselberg, H. Duadi, A. Lipovsky, R. Lubart, and D. Fixler, “Detecting nanoparticles in tissue using an optical iterative technique”, *Biomed. Opt. Express* **5**(11), 3871–3881 (2014).
- [72] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, M. D. Kozintseva, V. I. Kochubei, S. Yu. Gorodkov, and V. V. Tuchin, “Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm”, *Opt. Spectrosc.* **120**(1), 1–8 (2016).
- [73] J. Weissman, T. Hancewicz, and P. Kaplan, “Optical coherence tomography of skin for measurement of epidermal thickness by shapelet-based image analysis”, *Opt. Express* **12**(23), 5760–5769 (2004).
- [74] D. J. Carpenter, M. B. Sajisevi, N. Chapurin, C. S. Brown, T. Cheng, G. M. Palmer, D. S. Stevenson, C. L. Rao, R. P. Hall, and C. R. Woodard, “Noninvasive optical spectroscopy for identification of non-melanoma skin cancer: Pilot study”, *Lasers Surg. Med.* **50**(3), 246–252 (2018).
- [75] E. Drakaki, C. Dessinioti, A. J. Stratigos, C. Salavastru, and C. Antoniou, “Laser-induced fluorescence made simple: implications for the diagnosis and follow-up monitoring of basal cell carcinoma”, *JBO* **19**(3), 30901 (2014).
- [76] V. H. Maciel, W. R. Correr, C. Kurachi, V. S. Bagnato, and C. da Silva Souza, “Fluorescence spectroscopy as a tool to in vivo discrimination of distinctive skin disorders”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **19**, 45–50 (2017).
- [77] D. J. Leffell, M. L. Stetz, L. M. Milstone, and L. I. Deckelbaum, “In vivo fluorescence of human skin. A potential marker of photoaging”, *Arch. Dermatol.* **124**(10), 1514–1518 (1988).
- [78] W. Lohmann and E. Paul, “In situ detection of melanomas by fluorescence measurements”, *Naturwissenschaften* **75**(4), 201–202 (1988).
- [79] W. Lohmann, W. B. Schill, D. Bucher, T. Peters, M. Nilles, A. Schulz, and R. Bohle, “Elastosis and cancer”, *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* **49**(3–4), 223–229 (1994).
- [80] H. Zeng, C. MacAulay, D. I. McLean, B. Palcic, and H. Lui, “The dynamics of laser-induced changes in human skin autofluorescence--experimental measurements and theoretical modeling”, *Photochem. Photobiol.* **68**(2), 227–236 (1998).
- [81] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, “Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis”, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **47**, 555–606 (1996).
- [82] N. Kollias, R. Gillies, C. Cohén-Goihman, S. B. Phillips, J. A. Muccini, M. J. Stiller, and L. A. Drake, “Fluorescence photography in the evaluation of hyperpigmentation in photodamaged skin”, *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**(2), 226–230 (1997).
- [83] N. Kollias, R. Gillies, M. Moran, I. E. Kochevar, and R. R. Anderson, “Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging”, *J. Invest. Dermatol.* **111**(5), 776–780 (1998).
- [84] R. Gillies, G. Zonios, R. Rox Anderson, and N. Kollias, “Fluorescence Excitation Spectroscopy Provides Information About Human Skin In Vivo”, *J. Invest. Dermatol.* **115**(4), 704–707 (2000).
- [85] N. Kollias and G. N. Stamatas, “Optical non-invasive approaches to diagnosis of skin diseases”, *J. Invest. Derm. Symp. P.* **7**(1), 64–75 (2002).

- [86] M. A. Calin, S. V. Parasca, R. Savastru, M. R. Calin, and S. Dontu, “Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer”, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **139**(7), 1083–1104 (2013).
- [87] E. Borisova, P. Pavlova, E. Pavlova, P. Troyanova, and L. Avramov, “Optical Biopsy of Human Skin - A Tool for Cutaneous Tumours’ Diagnosis”, *Int. J. Bioautomation* **16**(1), 53-72 (2012).
- [88] Q. Liu, “Role of optical spectroscopy using endogenous contrasts in clinical cancer diagnosis”, *World Journal of Clinical Oncology* **2**(1), 50–63 (2011).
- [89] E. Borisova, E. Carstea, L. Cristescu, E. Pavlova, N. Hadjiolov, P. Troyanova, and L. Avramov, “Light-Induced Fluorescence Spectroscopy And Optical Coherence Tomography Of Basal Cell Carcinoma”, *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **2**(3), 261-268 (2009).
- [90] N. Rajaram, J. S. Reichenberg, M. R. Migden, T. H. Nguyen, and J. W. Tunnell, “Pilot clinical study for quantitative spectral diagnosis of non-melanoma skin cancer”, *Laser. Surg. Med.* **42**(10), 876–887 (2010).
- [91] D. Y. Churmakov, I. Meglinski, S. A. Piletsky, and D. A. Greenhalgh, “Analysis of skin tissues spatial fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation”, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**(14), 1722-1728 (2003).
- [92] R. Na, I. M. Stender, and H. C. Wulf, “Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence”, *Acta Derm. Venereol.* **81**(4), 246–249 (2001).
- [93] A. J. Thompson, S. Coda, M. B. Sørensen, G. Kennedy, R. Patalay, U. Waitong-Brämning, P. A. A. De Beule, M. A. A. Neil, S. Andersson-Engels, N. Bendsøe, P. M. W. French, K. Svanberg, and C. Dunsby, “In vivo measurements of diffuse reflectance and time-resolved autofluorescence emission spectra of basal cell carcinomas”, *J. Biophotonics* **5**(3), 240–254 (2012).
- [94] M. Panjehpour, C. E. Julius, M. N. Phan, T. Vo-Dinh, and S. Overholt, “Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers”, *Laser. Surg. Med.* **31**(5), 367–373 (2002).
- [95] L. Brancaleon, A. J. Durkin, J. H. Tu, G. Menaker, J. D. Fallon, and N. Kollias, “In vivo Fluorescence Spectroscopy of Nonmelanoma Skin Cancer”, *Photochem. Photobiol.* **73**(2), 178–183 (2001).
- [96] H. Zeng, D. I. M. M.d, C. E. MacAulay, B. Palcic, and H. L. M.d, “Autofluorescence of basal cell carcinoma”, in *Lasers in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems VIII* **3245**, 314–317 (1998).
- [97] E. Borisova, P. Troyanova, P. Pavlova, and L. Avramov, “Diagnostics of pigmented skin tumors based on laser-induced autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy”, *Quantum Electron.* **38**(6), 597 (2008).
- [98] A. O. Ustinova, I. A. Bratchenko, D. N. Artemyev, “Monte Carlo simulation of skin multispectral autofluorescence”, *JBPE* **5**(2), 020306 (2019).
- [99] S. Neus, T. Gambichler, F. G. Bechara, S. Wöhl, and P. Lehmann, “Preoperative assessment of basal cell carcinoma using conventional fluorescence diagnosis”, *Arch. Dermatol. Res.* **301**(4), 289–294 (2009).
- [100] S. K. Kamrava, M. Behtaj, Y. Ghavami, S. Shahabi, M. Jalessi, E. E. Afshar, and S. Maleki, “Evaluation of diagnostic values of photodynamic diagnosis in identifying the dermal and mucosal squamous cell carcinoma”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9**(4), 293–298 (2012).

- [101] M. M. Kleinpenning, E. W. Wolberink, T. Smits, W. A. M. Blokk, P. C. M. van De Kerkhof, P. E. J. van Erp, and R. M. J. P. Gerritsen, “Fluorescence diagnosis in actinic keratosis and squamous cell carcinoma”, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **26**(6), 297–302 (2010).
- [102] N. van der Beek, J. de Leeuw, C. Demmendaal, P. Bjerring, and H. A. M. Neumann, “PpIX fluorescence combined with auto-fluorescence is more accurate than PpIX fluorescence alone in fluorescence detection of non-melanoma skin cancer: an intra-patient direct comparison study”, *Lasers Surg. Med.* **44**(4), 271–276 (2012).
- [103] E. A. Edwards and S. Q. Duntley, “The pigments and color of living human skin”, *Am. J. Anat.* **65**(1), 1–33 (1939).
- [104] H. Arimoto, M. Egawa, and Y. Yamada, “Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin”, *Skin Res. Technol.* **11**(1), 27–35 (2005).
- [105] A. Koenig, B. Roig, J. Le Digabel, G. Josse, and J. -M. Dinten, “Assessing deep optical properties of skin using diffuse reflectance spectroscopy” in *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging IV*, 95360E (2015).
- [106] N. Kollias and A. Baqer, “On the assessment of melanin in human skin in vivo”, *Photochem. Photobiol.* **43**(1), 49–54 (1986).
- [107] N. Kollias and A. H. Baqer, “Quantitative assessment of UV-induced pigmentation and erythema”, *Photodermatol.* **5**(1), 53–60 (1988).
- [108] G. Zonios, J. Bykowski, and N. Kollias, “Skin melanin, hemoglobin, and light scattering properties can be quantitatively assessed in vivo using diffuse reflectance spectroscopy”, *J. Invest. Dermatol.* **117**(6), 1452–1457 (2001).
- [109] L. Wang, S. L. Jacques, and L. Zheng, “MCML—Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues”, *Comput. Meth. Prog. Bio.* **47**(2), 131–146 (1995).
- [110] D. Yudovsky and L. Pilon, “Rapid and accurate estimation of blood saturation, melanin content, and epidermis thickness from spectral diffuse reflectance”, *Appl. Opt.* **49**(10), 1707–1719 (2010).
- [111] F. Urbach, *Biological Responses to Ultraviolet A Radiation*, Valdenmar Pub, Overland Park (1992).
- [112] N. Kollias and A. Baqer, “An experimental study of the changes in pigmentation in human skin in vivo with visible and near infrared light”, *Photochem. Photobiol.* **39**(5), 651–659 (1984).
- [113] N. Kollias and A. H. Baqer, “Absorption mechanisms of human melanin in the visible, 400–720 nm”, *J. Invest. Dermatol.* **89**(4), 384–388 (1987).
- [114] I. A. Vitkin, J. Woolsey, B. C. Wilson, and R. R. Anderson, “Optical and thermal characterization of natural (*Sepia officinalis*) melanin”, *Photochem. Photobiol.* **59**(4), 455–462 (1994).
- [115] A. R. Young, “Chromophores in human skin”, *Phys. Med. Biol.* **42**(5), 789–802 (1997).
- [116] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, and E. Kaxiras, “Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection”, *JBO* **13**(1), 014017 (2008).
- [117] A. Garcia-Urbe, J. Zou, M. Duvic, J. H. Cho-Vega, V. G. Prieto, and L. V. Wang, “In vivo diagnosis of melanoma and nonmelanoma skin cancer using oblique incidence diffuse reflectance spectrometry”, *Cancer. Res.* **72**(11), 2738–2745 (2012).

- [118] M. Canpolat, A. Akman-Karakaş, G. A. Gökhan-Ocak, I. C. Başsorgun, M. Akif Çiftçioğlu, and E. Alpsoy, “Diagnosis and demarcation of skin malignancy using elastic light single-scattering spectroscopy: a pilot study”, *Dermatol. Surg.* **38**(2), 215–223 (2012).
- [119] M. Canpolat, A. Akman, M. A. Çiftçioğlu, and E. Alpsoy, “Detecting Skin Malignancy Using Elastic Light Scattering Spectroscopy”, in *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV*, 6628\_20 (2007).
- [120] Y. Jiao, T. Upile, W. Jerjes, H. Rhadi, S. Mosse, S. G. Brown, and C. Hopper, “Interrogation of skin pathology using elastic scattering spectroscopy”, *Head Neck Oncol.* **1**(1), O19 (2009).
- [121] T. Upile, W. Jerjes, H. Radhi, J. Mahil, A. Rao, and C. Hopper, “Elastic scattering spectroscopy in assessing skin lesions: an “in vivo” study”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **9**(2), 132–141 (2012).
- [122] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto, “Optical Coherence Tomography”, *Science* **254**(5035), 1178–1181 (1991).
- [123] J. G. Fujimoto and W. Drexler, “Introduction to OCT”, in *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*, W. Drexler and J. G. Fujimoto, Eds., 3–64, Springer, Cham (2015).
- [124] F. Harms, A. Latrive, and A. C. Boccara, “Time Domain Full Field Optical Coherence Tomography Microscopy”, in *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*, W. Drexler and J. G. Fujimoto, Eds., 791–812, Springer, Cham (2015).
- [125] J. F. de Boer, “Spectral/Fourier Domain Optical Coherence Tomography”, in *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*, W. Drexler and J. G. Fujimoto, Eds., 165–193, Springer, Cham (2015).
- [126] J. Ogien, O. Levecq, H. Azimani, A. Dubois, and A. Dubois, “Dual-mode line-field confocal optical coherence tomography for ultrahigh-resolution vertical and horizontal section imaging of human skin in vivo”, *Biomed. Opt. Express* **11**(3), 1327–1335 (2020).
- [127] J. K. Barton, K. W. Gossage, W. Xu, J. R. Ranger-Moore, K. Saboda, C. A. Brooks, L. D. Duckett, S. J. Salasche, J. A. Warneke, and D. S. Alberts, “Investigating sun-damaged skin and actinic keratosis with optical coherence tomography: a pilot study”, *Technol. Cancer. Res. Treat.* **2**(6), 525–535 (2003).
- [128] V. R. Korde, G. T. Bonnema, W. Xu, C. Krishnamurthy, J. Ranger-Moore, K. Saboda, L. D. Slayton, S. J. Salasche, J. A. Warneke, D. S. Alberts, and J. K. Barton, “Using optical coherence tomography to evaluate skin sun damage and precancer”, *Lasers Surg. Med.* **39**(9), 687–695 (2007).
- [129] T. M. Jørgensen, A. Tycho, M. Mogensen, P. Bjerring, and G. B. E. Jemec, “Machine-learning classification of non-melanoma skin cancers from image features obtained by optical coherence tomography”, *Skin Res. Technol.* **14**(3), 364–369 (2008).
- [130] M. Mogensen, T. M. Joergensen, B. M. Nürnberg, H. A. Morsy, J. B. Thomsen, L. Thrane, and G. B. E. Jemec, “Assessment of optical coherence tomography imaging in the diagnosis of non-melanoma skin cancer and benign lesions versus normal skin: observer-blinded evaluation by dermatologists and pathologists”, *Dermatol. Surg.* **35**(6), 965–972 (2009).
- [131] J. M. Olmedo, K. E. Warschaw, J. M. Schmitt, and D. L. Swanson, “Optical coherence tomography for the characterization of basal cell carcinoma in vivo: a pilot study”, *J. Am. Acad. Dermatol.* **55**(3), 408–412 (2006).

- [132] J. M. Olmedo, K. E. Warschaw, J. M. Schmitt, and D. L. Swanson, “Correlation of Thickness of Basal Cell Carcinoma by Optical Coherence Tomography In Vivo and Routine Histologic Findings: A Pilot Study”, *Dermatologic Surgery* **33**(4), 421–426 (2007).
- [133] T. Hinz, L. Ehler, T. Hornung, H. Voth, I. Fortmeier, T. Maier, T. Höller, and M. Wendtner, “Preoperative characterization of basal cell carcinoma comparing tumour thickness measurement by optical coherence tomography, 20-MHz ultrasound and histopathology”, *Acta Derm. Venereol.* **92**(2), 132–137 (2012).
- [134] P. Troyanova, E. Borisova, and L. Avramov, “Fluorescence and reflectance properties of hemoglobin-pigmented skin disorders”, in *International Conference on Lasers, Applications, and Technologies 2007: Laser Technologies for Medicine* **6734**, 142-149 (2007).
- [135] E. Carstea, L. Ghervase, G. Pavelescu, D. Savastru, and A. M. Forsea, “Combined optical techniques for skin lesion diagnosis: Short communication”, *Optoelectron. Adv. Mat.* **4**(12), 1960-1963 (2010).
- [136] V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*, SPIE, Bellingham (2005).
- [137] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Estimation of wavelength dependence of refractive index of collagen fibers of scleral tissue”, in *Controlling Tissue Optical Properties: Applications in Clinical Study*, 265–268 (2000).
- [138] L. M. Oliveira, M. I. Carvalho, E. M. Nogueira, and V. V. Tuchin, “Diffusion characteristics of ethylene glycol in skeletal muscle”, *JBO* **20**(5), 051019 (2014).
- [139] L. Oliveira, M. Carvalho, E. Nogueira, and V. Tuchin, “Optical clearing mechanisms characterization in muscle”, *J. Innov. Opt. Heal. Sci.* **9**(5), 1650035 (2016).
- [140] K. V. Larin, M. G. Ghosn, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, N. A. Trunina, and V. V. Tuchin, “Optical Clearing for OCT Image Enhancement and In-Depth Monitoring of Molecular Diffusion”, *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **18**(3), 1244–1259 (2012).
- [141] D. K. Tuchina, R. Shi, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, D. Zhu, Q. Luo, V. V. Tuchin, “Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin”, *J. Biophotonics* **8**(4), 332–346 (2015).
- [142] A. K. Bui, R. A. McClure, J. Chang, C. Stoianovici, J. Hirshburg, A. T. Yeh, and B. Choi, “Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO)”, *Lasers Surg. Med.* **41**(2), 142–148 (2009).
- [143] X. Wen, Z. Mao, Z. Han, V. V. Tuchin, and D. Zhu, “In vivo skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism”, *J. Biophotonics* **3**(1–2), 44–52 (2010).
- [144] V. V. Tuchin, “A Clear Vision for Laser Diagnostics (Review)”, *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **13**(6), 1621–1628 (2007).
- [145] F. S. Pavone, *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology*, 1<sup>st</sup> ed., Wiley-VCH, Weinheim (2010).
- [146] V. V. Tuchin, *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics*, 2<sup>nd</sup> ed., SPIE, Bellingham (2016).
- [147] I. L. Kon, V. V. Bakutkin, N. V. Bogomolova, S. V. Tuchin, D. A. Zimnyakov, and V. V. Tuchin, “Trazograph influence on osmotic pressure and tissue structures of human sclera”, in *Ophthalmic Technologies VII*, 198-206 (1997).
- [148] V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. H. Mavlyutov, and A. A. Mishin, “Light propagation in tissues with controlled optical properties”, *JBO* **2**(4), 401–417 (1997).

- [149] H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano, and A. Miyawaki, “Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain”, *Nat. Neurosci.* **14**(11), 1481-8 (2011).
- [150] H. Hama, H. Hioki, K. Namiki, T. Hoshida, H. Kurokawa, F. Ishidate, T. Kaneko, T. Akagi, T. Saito, T. Saïdo, and A. Miyawaki, “ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging”, *Nat. Neurosci.* **18**(10), 1518-29 (2015).
- [151] V. V. Tuchin, X. Xu, and R. K. Wang, “Dynamic optical coherence tomography in studies of optical clearing, sedimentation, and aggregation of immersed blood”, *Appl. Opt.* **41**(1), 258–271 (2002).
- [152] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, A. A. Korobko, E. A. Zubkova, V. V. Tuchin, I. Yaroslavsky, and G. B. Altshuler, “Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin”, *JBO* **13**(2), 021102 (2008).
- [153] D. Y. Churmakov, I. Meglinski, and D. A. Greenhalgh, “Amending of fluorescence sensor signal localisation in human skin by matching of the refractive index”, *JBO* **9**(2), 339-346 (2004).
- [154] I. Meglinski and D. Y. Churmakov, “Spatial Localisation of Biosensor Fluorescence Signals in Human Skin under the Effect of Equalisation of the Refractive Index of the Surrounding Medium”, *Opt. Spectrosc.* **96**(6), 946-951 (2004).
- [155] G. Vargas, E. K. Chan, J. K. Barton, H. G. Rylander III, and A. J. Welch, “Use of an agent to reduce scattering in skin”, *Lasers Surg. Med.* **24**(2), 133–141 (1999).
- [156] V. V. Tuchin, *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues*, 1<sup>st</sup> ed., Routledge & CRC Press, London (2009).
- [157] A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, “Reversible dissociation of collagen in tissues”, *J. Invest. Dermatol.* **121**(6), 1332–1335 (2003).
- [158] J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, “Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars”, *Lasers Surg. Med.* **39**(2), 140–144 (2007).
- [159] J. M. Hirshburg, K. M. Ravikumar, W. Hwang, and A. T. Yeh, “Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues”, *JBO* **15**(5), 055002 (2010).
- [160] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of the eye sclera in vivo caused by glucose”, *Quantum Electron.* **36**(12), 1119 (2006).
- [161] A. Bashkatov, A. N. Korolevich, V. V. Tuchin, Yu. P. Sinichkin, E. A. Genina, M. Stolnitz, N. S. Dubina, S. I. Vecherinski, and M. Belsley, “In vivo investigation of human skin optical clearing and blood microcirculation under the action of glucose solution”, *Asian J. Phys.* **15**(1), 1-14 (2006).
- [162] E. I. Galanzha, V. V. Tuchin, A. V. Solovieva, T. V. Stepanova, Q. Luo, and H. Cheng, “Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents”, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**(14), 1739–1746 (2003).
- [163] D. Zhu, J. Zhang, H. Cui, Z. Mao, P. Li, and Q. Luo, “Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorioallantoic membrane”, *JBO* **13**(2), 021106 (2008).
- [164] M. G. Ghosn, V. V. Tuchin, and K. V. Larin, “Depth-resolved monitoring of glucose diffusion in tissues by using optical coherence tomography”, *Opt. Lett.* **31**(15), 2314–2316 (2006).
- [165] A. Bashkatov, E. Genina, Yu. P. Sinichkin, V. Kochubey, N. Lakodina, and V. Tuchin, “Estimation of the glucose diffusion coefficient in human eye sclera”, *Biophysics* **48**, 292–296 (2003).

- [166] J. Wang, N. Ma, R. Shi, Y. Zhang, T. Yu, and D. Zhu, “Sugar-Induced Skin Optical Clearing: From Molecular Dynamics Simulation to Experimental Demonstration”, *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **20**(2), 256–262 (2014).
- [167] A. Bykov, T. Hautala, M. Kinnunen, A. Popov, S. Karhula, S. Saarakkala, M. T. Nieminen, V. Tuchin, and I. Meglinski, “Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage”, *J. Biophotonics* **9**(3), 270–275 (2016).
- [168] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of human dura mater by glucose solutions”, *JBPE* **3**(1), 010309 (2017).
- [169] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Y. P. Sinichkin, V. I. Kochubey, N. A. Lakodina, and V. V. Tuchin, “Glucose and Mannitol Diffusion in Human Dura Mater”, *Biophys. J.* **85**(5), 3310–3318 (2003).
- [170] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Optical Clearing of Cranial Bone”, *Advances in Optical Technologies* **2008**, e267867 (2008).
- [171] G. Vargas, J. K. Barton, and A. J. Welch, “Use of hyperosmotic chemical agent to improve the laser treatment of cutaneous vascular lesions”, *JBO* **13**(2), 021114 (2008).
- [172] Z. Zhu, G. Wu, H. Wei, H. Yang, Y. He, S. Xie, Q. Zhao, and X. Guo, “Investigation of the permeability and optical clearing ability of different analytes in human normal and cancerous breast tissues by spectral domain OCT”, *J. Biophotonics* **5**(7), 536–543 (2012).
- [173] B. Choi, L. Tsu, E. Chen, T. S. Ishak, S. M. Iskandar, S. Chess, and J. S. Nelson, “Determination of chemical agent optical clearing potential using in vitro human skin”, *Lasers Surg. Med.* **36**(2), 72–75 (2005).
- [174] Z. Mao, D. Zhu, Y. Hu, X. Wen, and Z. Han, “Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin in vitro”, *JBO* **13**(2), 021104 (2008).
- [175] E. Genina, A. Bashkatov, Y. Sinichkin, and V. Tuchin, “Optical clearing of skin under action of glycerol: Ex vivo and in vivo investigations”, *Opt. Spectrosc.* **109**, 225–231 (2010).
- [176] S. G. Proskurin and I. V. Meglinski, “Optical coherence tomography imaging depth enhancement by superficial skin optical clearing”, *Laser Phys. Lett.* **4**(11), 824 (2007).
- [177] M. H. Khan, B. Choi, S. Chess, K. M Kelly, J. McCullough, and J. S. Nelson, “Optical clearing of in vivo human skin: implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics”, *Lasers Surg. Med.* **34**(2), 83–85 (2004).
- [178] J. Jiang and R. K. Wang, “Comparing the synergistic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue in vitro”, *Phys. Med. Biol.* **49**(23), 5283–5294 (2004).
- [179] R. Shi, M. Chen, V. V. Tuchin, and D. Zhu, “Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing”, *Biomed. Opt. Express* **6**(6), 1977–1989 (2015).
- [180] X. Xu and R. K. Wang, “Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy”, *Phys. Med. Biol.* **49**(3), 457–468 (2004).
- [181] J. Jiang, M. Boese, P. Turner, and R. K. Wang, “Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging”, *JBO* **13**(2), 021105 (2008).
- [182] Z. Deng, L. Jing, N. Wu, P. Lv, X. Jiang, Q. Ren, and C. Li, “Viscous optical clearing agent for in vivo optical imaging”, *JBO* **19**(7), 76019 (2014).

- [183] L. Guo, R. Shi, C. Zhang, D. Zhu, Z. Ding, and P. Li, “Optical coherence tomography angiography offers comprehensive evaluation of skin optical clearing in vivo by quantifying optical properties and blood flow imaging simultaneously”, *JBO* **21**(8), 081202 (2016).
- [184] X. Jin, Z. Deng, J. Wang, Q. Ye, J. Mei, W. Zhou, C. Zhang, and J. Tian, “Study of the inhibition effect of thiazone on muscle optical clearing”, *JBO* **21**(10), 105004 (2016).
- [185] Y. Ding, J. Wang, Z. Fan, D. Wei, R. Shi, Q. Luo, D. Zhu, and X. Wei, “Signal and depth enhancement for in vivo flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents”, *Biomed. Opt. Express* **4**(11), 2518–2526 (2013).
- [186] H. Zhong, Z. Guo, H. Wei, L. Guo, C. Wang, Y. He, H. Xiong, S. Liu, “Synergistic effect of ultrasound and thiazone-PEG 400 on human skin optical clearing in vivo”, *Photochem. Photobiol.* **86**(3), 732–737 (2010).
- [187] R. Shi, L. Guo, C. Zhang, W. Feng, P. Li, Z. Ding, and D. Zhu, “A useful way to develop effective in vivo skin optical clearing agents”, *JBO* **10**(6–7), 887–895 (2017).
- [188] S. Plotnikov, V. Juneja, A. B. Isaacson, W. A. Mohler, and P. J. Campagnola, “Optical Clearing for Improved Contrast in Second Harmonic Generation Imaging of Skeletal Muscle”, *Biophys. J.* **90**(1), 328–339 (2006).
- [189] R. Cicchi, F. S. Pavone, D. Massi, and D. D. Sampson, “Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents”, *Opt. Express* **13**(7), 2337–2344 (2005).
- [190] X. Wen, S. L. Jacques, V. V. Tuchin, and D. Zhu, “Enhanced optical clearing of skin in vivo and optical coherence tomography in-depth imaging”, *JBO* **17**(6), 066022 (2012).
- [191] K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy, M. L. Chernavina, A. M. Likhter, and V. Tuchin, “Molecular modeling of post-diffusion phase of optical clearing of biological tissues”, in *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, Eds., 682, Routledge & CRC Press, Boca Raton (2022).
- [192] A. Nicholson, J. Sandler, and T. Seidle, “An evaluation of the US High Production Volume (HPV) chemical-testing programme: A study in (Ir)relevance, redundancy and retro thinking”, *Altern. Lab. Anim.* **32**, 335–341 (2004).
- [193] S. J. Jiang, S. M. Hwang, E. H. Choi, P. M. Elias, S. K. Ahn, and S. H. Lee, “Structural and functional effects of oleic acid and iontophoresis on hairless mouse stratum corneum”, *J. Invest. Dermatol.* **114**(1), 64–70 (2000).
- [194] S. J. Jiang and X. J. Zhou, “Examination of the mechanism of oleic acid-induced percutaneous penetration enhancement: an ultrastructural study”, *Biol. Pharm. Bull.* **26**(1), 66–68 (2003).
- [195] G. Vargas, A. Readinger, S. S. Dozier, and A. J. Welch, “Morphological Changes in Blood Vessels Produced by Hyperosmotic Agents and Measured by Optical Coherence Tomography”, *Photochem. Photobiol.* **77**(5), 541–549 (2003).
- [196] A. V. Liopo, R. Su, D. A. Tsybouski, and A. A. Oraevsky, “Optical clearing of skin enhanced with hyaluronic acid for increased contrast of optoacoustic imaging”, *JBO* **21**(8), 081208 (2016).
- [197] P. A. Timoshina, E. M. Zinchenko, D. K. Tuchina, M. M. Sagatova, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya, and V. V. Tuchin, “Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow of newborn mice at optical clearing”, in *Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII*, 1033610 (2017).
- [198] X. Xu and Q. Zhu, “Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer”, *Opt. Commun.* **279**, 223–228 (2007).

- [199] T. Kurihara-Bergstrom, K. Knutson, L. J. DeNoble, and C. Y. Goates, "Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water systems in human skin", *Pharm. Res.* **7**(7), 762–766 (1990).
- [200] E. Genina, A. Bashkatov, and V. Tuchin, "Effect of ethanol on the transport of methylene blue through stratum corneum", *Medical Laser Application* **23**, 31–38 (2008).
- [201] I. Vejnovic, L. Simmler, and G. Betz, "Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate", *Int. J. Pharm.* **386**(1–2), 185–194 (2010).
- [202] R. Notman, W. K. den Otter, M. G. Noro, W. J. Briels, and J. Anwar, "The Permeability Enhancing Mechanism of DMSO in Ceramide Bilayers Simulated by Molecular Dynamics", *Biophys. J.* **93**(6), 2056–2068 (2007).
- [203] P. J. Caspers, A. C. Williams, E. A. Carter, H. G. M. Edwards, B. W. Barry, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, "Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy", *Pharm. Res.* **19**(10), 1577–1580 (2002).
- [204] C. H. Chang, E. M. Myers, M. J. Kennelly, and N. M. Fried, "Optical clearing of vaginal tissues, ex vivo, for minimally invasive laser treatment of female stress urinary incontinence", *JBO* **22**(1), 018002 (2017).
- [205] A. P. Funke, R. Schiller, H. W. Motzkus, C. Günther, R. H. Müller, and R. Lipp, "Transdermal delivery of highly lipophilic drugs: in vitro fluxes of antiestrogens, permeation enhancers, and solvents from liquid formulations", *Pharm. Res.* **19**(5), 661–668 (2002).
- [206] J. M. Andanson, K. L. A. Chan, and S. G. Kazarian, "High-throughput spectroscopic imaging applied to permeation through the skin", *Appl. Spectrosc.* **63**(5), 512–517 (2009).
- [207] A. C. Williams and B. W. Barry, "Penetration enhancers", *Adv. Drug Deliver. Rev.* **64**, 128–137 (2012).
- [208] M. B. Brown and S. A. Jones, "Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin", *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **19**(3), 308–318 (2005).
- [209] H. S. Jung, K. S. Kim, S. H. Yun, and S. K. Hahn, "Enhancing the transdermal penetration of nanoconstructs: could hyaluronic acid be the key?", *Nanomedicine* **9**(6), 743–745 (2014).
- [210] M. Witting, A. Boreham, R. Brodewolf, K. Vávrová, U. Alexiev, W. Friess, and S. Hedtrich, "Interactions of hyaluronic Acid with the skin and implications for the dermal delivery of biomacromolecules", *Mol. Pharm.* **12**(5), 1391–1401 (2015).
- [211] H. J. Weigmann, J. Lademann, S. Schanzer, U. Lindemann, R. von Pelchrzim, H. Schaefer, W. Sterry, and V. Shah, "Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape-stripping to differences in bioavailability", *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **14**, 98–102 (2001).
- [212] R. J. McNichols, M. A. Fox, A. Gowda, S. Tuya, B. Bell, and M. Motamedi, "Temporary dermal scatter reduction: quantitative assessment and implications for improved laser tattoo removal", *Lasers Surg. Med.* **36**(4), 289–296 (2005).
- [213] O. Stumpp, B. Chen, and A. J. Welch, "Using sandpaper for noninvasive transepidermal optical skin clearing agent delivery", *JBO* **11**(4), 041118 (2006).
- [214] W. R. Lee, R. Y. Tsai, C. L. Fang, C. J. Liu, C. H. Hu, and J. Y. Fang, "Microdermabrasion as a novel tool to enhance drug delivery via the skin: an animal study", *Dermatol. Surg.* **32**(8), 1013–1022 (2006).

- [215] C. Tse, M. J. Zohdy, J. Y. Ye, and M. O'Donnell, "Penetration and Precision of Subsurface Photodisruption in Porcine Skin Tissue With Infrared Femtosecond Laser Pulses", *IEEE T. Bio-Med. Eng.* **55**(3), 1211–1218 (2008).
- [216] C. Liu, Z. Zhi, V. V. Tuchin, Q. Luo, and D. Zhu, "Enhancement of skin optical clearing efficacy using photo-irradiation", *Lasers Surg. Med.* **42**(2), 132–140 (2010).
- [217] V. V. Tuchin, G. B. Altshuler, A. A. Gavrilova, A. B. Pravdin, D. Tabatadze, J. Childs, and I. V. Yaroslavsky, "Optical clearing of skin using flash lamp-induced enhancement of epidermal permeability", *Lasers Surg. Med.* **38**(9), 824–836 (2006).
- [218] J. Yoon, T. Son, E. H. Choi, B. Choi, J. S. Nelson, and B. Jung, "Enhancement of optical skin clearing efficacy using a microneedle roller", *JBO* **13**(2), 021103 (2008).
- [219] O. F. Stumpp, A. J. Welch, T. E. Milner, and J. Neev, "Enhancement of transepidermal skin clearing agent delivery using a 980 nm diode laser", *Lasers Surg. Med.* **37**(4), 278–285 (2005).
- [220] N. S. Ksenofontova, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, G. S. Terentyuk, and V. V. Tuchin, "OCT study of skin optical clearing with preliminary laser ablation of epidermis", *JBPE* **3**(2), 020307 (2017).
- [221] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, G. S. Terentyuk, and V. V. Tuchin, "Integrated effects of fractional laser microablation and sonophoresis on skin immersion optical clearing in vivo", *J. Biophotonics* **13**(7), e202000101 (2020).
- [222] A. K. Nugroho, G. L. Li, M. Danhof, and J. A. Bouwstra, "Transdermal iontophoresis of rotigotine across human stratum corneum in vitro: influence of pH and NaCl concentration", *Pharm. Res.* **21**(5), 844–850 (2004).
- [223] E. A. Genina, Y. I. Surkov, I. A. Serebryakova, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, and V. P. Zharov, "Rapid Ultrasound Optical Clearing of Human Light and Dark Skin", *IEEE T. Med. Imaging* **39**(10), 3198–3206 (2020).
- [224] X. Xu and Q. Zhu, "Sonophoretic Delivery for Contrast and Depth Improvement in Skin Optical Coherence Tomography", *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **14**(1), 56–61 (2008).
- [225] A. Davidson, B. Al-Qallaf, D. Bhusan Das, "Transdermal drug delivery by coated microneedles: Geometry effects on effective skin thickness and drug permeability", *Chem. Eng. Res. Des.* **86**(11), 1196–1206 (2008).
- [226] T. Rattanapak, J. Birchall, K. Young, M. Ishii, I. Meglinski, T. Rades, and S. Hook, "Transcutaneous immunization using microneedles and cubosomes: Mechanistic investigation using Optical Coherence Tomography and Two-Photon Microscopy", *J. Control. Release* **172**(3), 894 – 903 (2013).
- [227] B. E. Polat, D. Hart, R. Langer, and D. Blankschtein, "Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends", *J. Control. Release* **152**(3), 330–348 (2011).
- [228] X. Xu and C. Sun, "Ultrasound enhanced skin optical clearing: microstructural changes", *J. Innov. Opt. Health Sci.* **3**(3), 189–194 (2010).
- [229] A. Tezel and S. Mitragotri, "Interactions of Inertial Cavitation Bubbles with Stratum Corneum Lipid Bilayers during Low-Frequency Sonophoresis", *Biophys. J.* **85**(6), 3502–3512 (2003).
- [230] X. Xu, Q. Zhu, and C. Sun, "Assessment of the effects of ultrasound-mediated alcohols on skin optical clearing", *JBO* **14**(3), 034042 (2009).
- [231] X. Xu, Q. Zhu, and C. Sun, "Combined Effect of Ultrasound-SLS on Skin Optical Clearing", *IEEE Photonic. Tech. L.* **20**(24), 2117–2119 (2008).

- [232] S. M. Zaytsev, Yu. I. Svenskaya, E. V. Lengert, G. S. Terentyuk, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, and E. A. Genina, “Optimized skin optical clearing for optical coherence tomography monitoring of encapsulated drug delivery through the hair follicles”, *J. Biophotonics* **13**(4), e201960020 (2020).
- [233] M. A. Fox, D. G. Diven, K. Sra, A. Boretsky, T. Poonawalla, A. Readinger, M. Motamedi, and R. J. McNichols, “Dermal scatter reduction in human skin: a method using controlled application of glycerol”, *Lasers Surg. Med.* **41**(4), 251–255 (2009).
- [234] J. Yoon, D. Park, T. Son, J. Seo, J. S. Nelson, and B. Jung, “A physical method to enhance transdermal delivery of a tissue optical clearing agent: Combination of microneedling and sonophoresis”, *Lasers Surg. Med.* **42**(5), 412–417 (2010).
- [235] Y. A. Menyayev, D. A. Nedosekin, M. Sarimollaoglu, M. A. Juratli, E. I. Galanzha, V. V. Tuchin, and V. P. Zharov, “Optical clearing in photoacoustic flow cytometry”, *Biomed. Opt. Express* **4**(12), 3030–3041 (2013).
- [236] Y. M. Liew, R. A. McLaughlin, F. M. Wood, and D. D. Sampson, “Reduction of image artifacts in three-dimensional optical coherence tomography of skin in vivo”, *JBO* **16**(11), 116018 (2011).
- [237] R. K. Wang and V. V. Tuchin, “Enhance light penetration in tissue for high resolution optical imaging techniques by the use of biocompatible chemical agents”, *J. Xray Sci. Technol.* **10**(3), 167–176 (2002).
- [238] L. Pires, V. Demidov, I. A. Vitkin, V. S. Bagnato, C. Kurachi, and B. C. Wilson, “Optical clearing of melanoma in vivo: characterization by diffuse reflectance spectroscopy and optical coherence tomography”, *JBO* **21**(8), 081210 (2016).
- [239] R. He, H. Wei, H. Gu, Z. Zhu, Y. Zhang, X. Guo, T. Cai, “Effects of optical clearing agents on noninvasive blood glucose monitoring with optical coherence tomography: a pilot study”, *JBO* **17**(10), 101513 (2012).
- [240] Q. Zhao, C. Dai, S. Fan, J. Lv, and L. Nie, “Synergistic efficacy of salicylic acid with a penetration enhancer on human skin monitored by OCT and diffuse reflectance spectroscopy”, *Sci. Rep.* **6**(1), 34954 (2016).
- [241] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, I. V. Korovina, V. I. Kochubey, Y. P. Sinichkin, and V. V. Tuchin, “In-vivo and in-vitro study of control of rat skin optical properties by action of osmotical liquid”, in *Biomedical Photonics and Optoelectronic Imaging*, 300–311 (2000).
- [242] Z. Mao, X. Wen, J. Wang, and D. Zhu, “The biocompatibility of the dermal injection of glycerol in vivo to achieve optical clearing”, in *Eighth International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine*, 75191N (2009).
- [243] D. K. Tuchina, P. A. Timoshina, V. V. Tuchin, A. N. Bashkatov, and E. A. Genina, “Kinetics of Rat Skin Optical Clearing at Topical Application of 40% Glucose: Ex Vivo and In Vivo Studies”, *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **25**(1), 1–8 (2019).
- [244] E. D. Jansen, P. M. Pickett, M. A. Mackanos, and J. Virostko, “Effect of optical tissue clearing on spatial resolution and sensitivity of bioluminescence imaging”, *JBO* **11**(4), 041119 (2006).
- [245] S. Karma, J. Homan, C. Stoianovici, and B. Choi, “Enhanced fluorescence imaging with dmsom-mediated optical clearing”, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **3**(3), 153–158 (2010).
- [246] A. F. Pena, A. Doronin, V. V. Tuchin, and I. Meglinski, “Monitoring of interaction of low frequency electric field with biological tissues upon optical clearing with Optical Coherence Tomography”, *JBO* **19**(8), 086002 (2014).

- [247] P. Rakotomanga, C. Soussen, G. Khairallah, M. Amouroux, S. Zaytsev, E. Genina, H. Chen, A. Delconte, C. Daul, V. Tuchin, and W. Blondel, “Source separation approach for the analysis of spatially resolved multiply excited autofluorescence spectra during optical clearing of ex vivo skin”, *Biomed. Opt. Express* **10**(7), 3410–3424 (2019).
- [248] S. M. Zaytsev, W. Blondel, M. Amouroux, G. Khairallah, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin, and E. A. Genina, “Optical spectroscopy as an effective tool for skin cancer features analysis: applicability investigation”, in *Saratov Fall Meeting 2019: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine* **11457**, 1145706 (2020).
- [249] H. Takeuchi, Y. Mano, S. Terasaka, T. Sakurai, A. Furuya, H. Urano, and K. Sugibayashi, “Usefulness of Rat Skin as a Substitute for Human Skin in the in Vitro Skin Permeation Study”, *Experimental Animals* **60**(4), 373–384 (2011).
- [250] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, and V. V. Tuchin, “Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm”, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38**(15), 2543–2555 (2005).
- [251] G. Vargas, K. F. Chan, S. L. Thomsen, and A. J. Welch, “Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue: Effects on the detected fluorescence signal measured through skin”, *Lasers Surg. Med.* **29**(3), 213–220 (2001).
- [252] X. Wen, V. V. Tuchin, Q. Luo, and D. Zhu, “Controlling the scattering of Intralipid by using optical clearing agents”, *Phys. Med. Biol.* **54**(22), 6917–6930 (2009).
- [253] P. D. Ninni, F. Martelli, and G. Zaccanti, “The use of India ink in tissue-simulating phantoms”, *Opt. Express* **18**(26), 26854–26865 (2010).
- [254] S. K. S. Lightbourne, H. B. Gobeze, N. K. Subbaiyan, and F. D’Souza, “Chlorin e6 sensitized photovoltaic cells: effect of co-adsorbents on cell performance, charge transfer resistance, and charge recombination dynamics”, *J. Photon. Energy* **5**(1), 053089 (2015).
- [255] M. Amouroux, W. Blondel, and A. Delconte (2017). *Medical Device for Fibred Bimodal Optical Spectroscopy* (patent No. WO2017093316). Available: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2017093316>
- [256] W. Blondel, A. Delconte, G. Khairallah, F. Marchal, A. Gavaille, and M. Amouroux, “Spatially-Resolved Multiply-Excited Autofluorescence and Diffuse Reflectance Spectroscopy: SpectroLive Medical Device for Skin In Vivo Optical Biopsy”, *Electronics* **10**(3), 243 (2021).
- [257] N. Kollias, G. Zonios, and G. N. Stamatas, “Fluorescence spectroscopy of skin”, *Vib. Spectrosc.* **28**(1), 17–23 (2002).
- [258] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, Y. P. Sinichkin, I. Y. Yanina, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of biological tissues: prospects of application in medical diagnostics and phototherapy”, *JBPE* **1**(1), 22–58 (2015).
- [259] A. A. Gurjarpadhye, W. C. Vogt, Y. Liu, and C. G. Rylander, “Effect of Localized Mechanical Indentation on Skin Water Content Evaluated Using OCT”, *Int. J. Biomed. Imaging* **2011**, 817250 (2011).
- [260] V. Colas, W. Blondel, G. Khairallah, C. Daul, and M. Amouroux, “Proposal for a Skin Layer-Wise Decomposition Model of Spatially-Resolved Diffuse Reflectance Spectra Based on Maximum Depth Photon Distributions: A Numerical Study”, *Photonics* **8**(10), 444 (2021).
- [261] V. Carrer, C. Alonso, M. Pont, M. Zanuy, M. Córdoba, S. Espinosa, C. Barba, M. A. Oliver, M. Martí, and L. Coderch, “Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs”, *Arch. Dermatol. Res.* **312**(5), 337–352 (2020).

- [262] A. N. C. Anigbogu, A. C. Williams, B. W. Barry, and H. G. M. Edwards, “Fourier transform raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum”, *Int. J. Pharm.* **125**(2), 265–282 (1995).
- [263] C. R. Idelson, W. C. Vogt, B. King-Casas, S. M. LaConte, and C. G. Rylander, “Effect of mechanical optical clearing on near-infrared spectroscopy”, *Lasers Surg. Med.* **47**(6), 495–502 (2015).
- [264] M. Y. Kirillin, P. D. Agrba, and V. A. Kamensky, “In vivo study of the effect of mechanical compression on formation of OCT images of human skin”, *J. Biophotonics* **3**(12), 752–758 (2010).
- [265] C. Li, J. Jiang, and K. Xu, “The variations of water in human tissue under certain compression: studied with diffuse reflectance spectroscopy”, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **6**(1), 1350005 (2012).
- [266] I. A. Nakhaeva, O. A. Zyuryukina, M. R. Mohammed, and Yu. P. Sinichkin, “The effect of external mechanical compression on in vivo water content in human skin”, *Opt. Spectrosc.* **118**(5), 834–840 (2015).
- [267] A. Попов, А. Быков, and I. Meglinski, “Influence of probe pressure on diffuse reflectance spectra of human skin measured in vivo”, *JBO* **22**(11), 110504 (2017).
- [268] О. А. Зюрюкина, Ю. П. Синичкин, “Дегидратация биотканей в процессе их компрессии”, *Известия Саратовского университета, Новая серия, Серия Физика*, **20**(2), 92-102 (2020).
- [269] T. Yu, D. Zhu, L. Oliveira, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Tissue optical clearing mechanisms”, in *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, Eds., 682, Routledge & CRC Press, Boca Raton (2022).
- [270] J. M. Schmitt and G. Kumar, “Optical scattering properties of soft tissue: a discrete particle model”, *Appl. Opt.* **37**(13), 2788–2797 (1998).
- [271] C. G. Rylander, O. F. Stumpp, T. E. Milner, N. J. Kemp, J. M. Mendenhall, K. R. Diller, and A. J. Welch, “Dehydration mechanism of optical clearing in tissue”, *JBO* **11**(4), 041117 (2006).
- [272] M. E. Shvachkina, D. D. Yakovlev, E. N. Lazareva, A. B. Pravdin, and D. A. Yakovlev, “Monitoring of the Process of Immersion Optical Clearing of Collagen Bundles Using Optical Coherence Tomography”, *Opt. Spectrosc.* **127**(2), 359–367 (2019).
- [273] A. Y. Sdobnov, M. E. Darwin, J. Schleusener, J. Lademann, and V. V. Tuchin, “Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy”, *J. Biophotonics* **12**(5), e201800283 (2019).
- [274] “U. S. Food and Drug Administration, Inactive Ingredients Database”, *FDA.gov*, Retrieved 12 February 2019, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>.
- [275] C. Gorzelanny, C. Mess, S. W. Schneider, V. Huck, and J. M. Brandner, “Skin Barriers in Dermal Drug Delivery: Which Barriers Have to Be Overcome and How Can We Measure Them?”, *Pharmaceutics* **12**(7), 684 (2020).
- [276] J. A. Bouwstra and M. Ponc, “The skin barrier in healthy and diseased state”, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**(12), 2080–2095 (2006).
- [277] E. A. Genina, A. N. Bashkatov, V. P. Zharov, and V. V. Tuchin, “In vivo skin optical clearing in humans”, in *Handbook of Tissue Optical Clearing: New Prospects in Optical Imaging*, V. V. Tuchin, D. Zhu, and E. A. Genina, Eds., 682, Routledge & CRC Press, Boca Raton (2022).

- [278] V. V. Tuchin, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Yu. P. Sinichkin, and N. A. Lakodina, “In vivo investigation of the immersion-liquid-induced human skin clearing dynamics”, *Tech. Phys. Lett.* **27**(6), 489–490 (2001).
- [279] N. Sudheendran, M. Mohamed, M. G. Ghosn, V. V. Tuchin, and K. V. Larin, “Assessment of tissue optical clearing as a function of glucose concentration using optical coherence tomography”, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **3**(3), 169–176 (2010).
- [280] E. Peli, “Contrast in complex images”, *J. Opt. Soc. Am. A.* **7**(10), 2032–40 (1990).
- [281] I. Meglinski, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, D. Y. Churmakov, and V. V. Tuchin, “Study of the possibility of increasing the probing depth by the method of reflection confocal microscopy upon immersion clearing of near-surface human skin layers”, *Quantum Electron.* **32**(10), 875–882 (2002).
- [282] I. Meglinski, D. Y. Churmakov, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, and V. V. Tuchin, “The Enhancement of Confocal Images of Tissues at Bulk Optical Immersion”, *Laser Phys.* **13**(1), 65 – 69 (2003).
- [283] I. Meglinski and V. V. Tuchin, “The enhancement of confocal probing with optical clearing”, in *Advances in Biomedical Photonics and Imaging*, Q. Luo, L. V. Wang, and V. V. Tuchin, Eds., 33–38, World Scientific, Singapore (2008).
- [284] A. P. Popov, A. V. Zvyagin, J. Lademann, M. S. Roberts, W. Sanchez, A. V. Priezhev, and R. Myllyla, “Designing inorganic light-protective skin nanotechnology products”, *J. Biomed. Nanotechnol.* **6**(5), 432 – 451 (2010).
- [285] J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, S. Jung, M. C. Meinke, E. Rühl, U. Alexiev, M. Calderon, and A. Patzelt, “Hair follicles as a target structure for nanoparticles”, *J. Innov. Opt. Health Sci.* **8**(4), 1530004 (2015).
- [286] J. Lademann, H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, B. Weiss, U. F. Schaefer, C. M. Lehr, R. Wepf, and W. Sterry, “Nanoparticles - an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles”, *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **66**(2), 159–164 (2007).
- [287] S. Jung, A. Patzelt, N. Otberg, G. Thiede, W. Sterry, and J. Lademann, “Strategy of topical vaccination with nanoparticles”, *JBO* **14**(2), 021001 (2009).
- [288] E. A. Genina, L. E. Dolotov, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, “Fractional laser microablation of skin: increasing the efficiency of transcutaneous delivery of particles”, *Quantum Electronics* **46**(6), 502–509 (2016).
- [289] E. A. Genina, G. S. Terentyuk, A. N. Bashkatov, B. N. Khlebtsov, and V. V. Tuchin, “Visualisation of distribution of gold nanoparticles in liver tissues ex vivo and in vitro using the method of optical coherence tomography”, *Quantum Electronics* **42**(6), 478–483 (2012).
- [290] B. V. Parakhonskiy, A. Haase, and R. Antolini, “Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release”, *Angew. Chem. Int. Edit.* **51**(5), 1195–1197 (2012).
- [291] Yu. I. Svenskaya, N. A. Navolokin, A. B. Bucharskaya, G. S. Terentyuk, A. O. Kuzmina, M. M. Burashnikova, G. N. Maslyakova, E. A. Lukyanets, and D. A. Gorin, “Calcium carbonate microparticles containing a photosensitizer photosens: Preparation, ultrasound stimulated dye release, and in vivo application”, *Nanotechnol. Russia* **9**(7), 398–409 (2014).
- [292] E. K. Volkova, I. Y. Yanina, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, J. G. Konyukhova, A. P. Popov, E. S. Speranskaya, A. B. Bucharskaya, N. A. Navolokin, I. Y. Goryacheva, V. I. Kochubey, G. B. Sukhorukov, I. V. Meglinski, and V. V. Tuchin, “Delivery and reveal of localization of upconversion luminescent microparticles and quantum dots in the skin *in vivo* by fractional

- laser microablation, multimodal imaging, and optical clearing”, *JBO* **23**(2), 026001-1-026001-11 (2018).
- [293] E. A. Genina, G. S. Terentyuk, A. N. Bashkatov, N. A. Mikheeva, E. A. Kolesnikova, M. V. Basko, B. N. Khlebtsov, N. G. Khlebtsov, and V. V. Tuchin, “Comparative study of the physical, chemical, and multimodal approaches to enhancing nanoparticle transport in the skin with model dermatitis”, *Nanotechnol Russia* **9**(9), 559–570 (2014).
- [294] H. Zhong, Z. Guo, H. Wei, C. Zeng, H. Xiong, Y. He, and S. Liu, “In vitro study of ultrasound and different-concentration glycerol-induced changes in human skin optical attenuation assessed with optical coherence tomography”, *JBO* **15**(3), 036012 (2010).
- [295] A. Azagury, L. Khoury, G. Enden, and J. Kost, “Ultrasound mediated transdermal drug delivery”, *Adv Drug Deliv Rev* **72**, 127–143 (2014).
- [296] D. K. Tuchina, V. D. Genin, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, and V. V. Tuchin, “Optical clearing of skin tissue ex vivo with polyethylene glycol”, *Opt. Spectrosc.* **120**(1), 28–37 (2016).
- [297] M. Zimmerley, R. A. McClure, B. Choi, and E. O. Potma, “Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy”, *Appl Opt* **48**(10), 79-87 (2009).
- [298] M. J. Weber, *Handbook of Optical Materials*, CRC Press, Boca Raton (2002).
- [299] M. Mogensen, S. Bojesen, N. M. Israelsen, M. Maria, M. Jensen, A. Podoleanu, O. Bang, and M. Haedersdal, “Two optical coherence tomography systems detect topical gold nanoshells in hair follicles, sweat ducts and measure epidermis”, *J. Biophotonics* **11**(9), e201700348 (2018).
- [300] A. N. Bashkatov, K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy, M. L. Chernavina, E. A. Genina, V. D. Genin, V. I. Kochubey, E. N. Lazareva, A. B. Pravdin, M. E. Shvachkina, P. A. Timoshina, D. K. Tuchina, D. D. Yakovlev, D. A. Yakovlev, I. Yu. Yanina, O. S. Zhernovaya, and V. V. Tuchin, “Measurement of tissue optical properties in the context of tissue optical clearing”, *JBO* **23**(9), 091416 (2018).
- [301] A. Patzelt, H. Richter, F. Knorr, U. Schafer, C.-M. Lehr, L. Dahne, W. Sterry, and J. Lademann, “Selective follicular targeting by modification of the particle sizes”, *J. Control. Release* **150**(1), 45–48 (2011).
- [302] R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, and U. Blume-Peytavi, “Penetration Profile of Microspheres in Follicular Targeting of Terminal Hair Follicles”, *J. Invest. Dermatol.* **123**(1), 168–176 (2004).
- [303] C. S. K. Fuchs, V. K. Ortner, M. Mogensen, P. A. Philipsen, and M. Haedersdal, “Transfollicular delivery of gold microparticles in healthy skin and acne vulgaris, assessed by in vivo reflectance confocal microscopy and optical coherence tomography”, *Lasers Surg. Med.* **51**(5), 430-438 (2019).
- [304] R. Su, W. Fan, Q. Yu, X. Dong, J. Qi, Q. Zhu, W. Zhao, W. Wu, Z. Chen, Y. Li, and Y. Lu, “Size-dependent penetration of nanoemulsions into epidermis and hair follicles: implications for transdermal delivery and immunization”, *Oncotarget* **8**(24), 38214–38226 (2017).