

## МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В ДЕРМАТОЛОГИИ ПРИ ОПТИЧЕСКОМ ПРОСВЕТЛЕНИИ КОЖИ

©2019 г. А. Ю. СДОБНОВ<sup>1,2</sup>, Ю. ЛАДЕМАНН<sup>3</sup>,  
М. Е. ДАРВИН<sup>3,\*</sup>, В. В. ТУЧИН<sup>2,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Information Technology and Electrical Engineering,  
University of Oulu, Оулу

<sup>2</sup> Научно-образовательный институт оптики и биофотоники,  
Саратовский национальный исследовательский государственный  
университет, Саратов

<sup>3</sup> Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Department  
of Dermatology, Venerology and Allergology, Charité – Universitätsmedizin  
Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität  
zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Берлин

<sup>4</sup> Лаборатория лазерной диагностики технических и живых систем,  
Институт точной механики и управления РАН, Саратов

<sup>5</sup> Междисциплинарная лаборатория биофотоники, Национальный  
исследовательский томский государственный университет, Томск

I. Введение. II. Основные механизмы оптического просветления.  
III. Оптические просветляющие агенты и их усилители. IV. Много-  
фотонная томография. V. Спектроскопия КР. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Кожа – это внешний орган, покрывающий тело позвоночных животных, представляющий собой барьер между живым организмом и окружающей средой [1, 2]. Помимо защиты от внешних механических воздействий и предотвращения проникновения патогенов, кожа также участвует в терморегуляции, дыхании, обменных процессах и

---

*Принятые сокращения:* АФ – автофлуоресценция; ГКР – гигантское КР; ГВГ – генерация второй гармоники; ДМСО – диметилсульфоксид; КАСКР – когерентная антистоксова спектроскопия КР; КР – комбинационное рассеяние; МКР – микроскопия КР; МФТ – многофотонная томография; ОКТ – оптическая когерентная томография; ОП – оптическое просветление; ОПА – оптический просветляющий агент; ПЭГ – полиэтилен гликоль; СКР – спектроскопии КР; ФА – фотоакустика; ФАТ – ФА томография; TDE – 2,2' – тиодизтанол.

*Адрес для корреспонденции:* [sdobnovanton@mail.ru](mailto:sdobnovanton@mail.ru).

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства РФ 14.W03.31.0023.

\* Оба автора внесли одинаковый вклад в данную работу.

регуляции испарения воды [3–5]. Кожа является самым большим по площади органом в человеческом организме. Изучение ее структуры, возможность раннего детектирования развития кожных болезней, мониторинг и контроль проникновения лекарственных препаратов, а также исследование изменений, связанных со старением, являются важными задачами для современной биомедицины, которые можно успешно решать с помощью средств молекулярной спектроскопии и визуализации. Как правило, первичная оценка состояния кожного покрова проводится дерматологами визуально «на глаз». Тем не менее, для точного диагностирования онкологических заболеваний кожи необходимо исследовать образцы биопсий. Поскольку биопсия является инвазивной и достаточно болезненной для пациента процедурой, представляющей собой мини операцию, разработка неинвазивных методов диагностики кожных заболеваний, а также методов мониторинга проникновения и воздействия лекарственных препаратов на те или иные структуры кожи, является перспективным направлением для современных научных исследований.

На данный момент существует большой спектр неинвазивных оптических методов исследования кожи *in vivo*, таких как оптическая когерентная томография (ОКТ) [6, 7], спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) [8–12], многофотонная томография (МФТ) [13–16], лазерная спекл-визуализация [17, 18], флуоресцентная спектроскопия [19, 20], лазерная сканирующая микроскопия [21–23], и т.д. Все эти методы могут работать в режиме имиджинга. Наибольший интерес для клинических исследований представляет не отдельное использование каждого из этих методов, а совместное использование нескольких оптических методов, так называемая мульти-модальная визуализация [24]. Данный подход, комбинирующий несколько различных оптических методов изучения биологических тканей, позволяет одновременно получать информацию на функциональном и молекулярном уровнях, значительно увеличивая эффективность диагностики и последующего контроля лечения кожных заболеваний. На данный момент уже существует множество методов мульти-модальной визуализации кожи, например комбинированное использование ОКТ и фотоакустической (ФА) томографии (ФАТ) [25], а также ОКТ и МФТ [26]. Совместное использование терагерцовой импульсной и поляризационной визуализации было применено для классификации клеток немеланомного рака кожи [27]. Конфокальная рефлектометрия, комбинированная с автофлуоресцентной томографией были использованы для детектирования ранних стадий рака кожи [28]. Следует заметить, что при исследовании кожи методом МФТ, часто

используется совмещение независимых каналов детектирования, таких как автофлуоресценция (при возбуждении на разных длинах волн), время жизни автофлуоресценции, генерация второй гармоники, когерентная антистоксова спектроскопия КР (КАСКР) липидов и воды, что обеспечивает мультимодальность таких измерений [29–33]. Как правило, применение мультимодальных оптических методов в дерматологии направлено на увеличение порога чувствительности при диагностике различных видов рака кожи.

Тем не менее, все описанные оптические методы для исследования кожи имеют критическое ограничение, не позволяющее получать информацию из глубоких слоев кожи в видимом и инфракрасном диапазоне. Данное ограничение связано с тем, что роговой слой и живой эпидермис обладают особо сильным рассеянием света, в то же время и более глубокие слои кожи, такие как дерма и гипердерма, имеют достаточно большие коэффициенты рассеяния, в десятки и сотни раз превышающие коэффициенты поглощения [34, 35]. Для того, чтобы увеличить глубину детектирования оптических систем, а также пространственное разрешение и контраст получаемых изображений, в 90-е годы прошлого века был разработан метод оптического просветления (ОП) [34, 36–38]. Влияние различных оптических просветляющих агентов (ОПА), таких как глицерин [39], глюкоза [40, 41], диметилсульфоксид (ДМСО) [42], и т.д., на кожу и другие биологические ткани были исследованы с помощью таких оптических методов как ОКТ [43, 44], МФТ [45, 46], спектроскопия КР [47, 48], ФАТ [49–54], ФА пролетной цитометрии (ФАПЦ) [55], и т.д.

В данной обзорной статье представлены результаты исследований эффективности ОП при использовании методов оптического молекулярного имиджинга для диагностики в дерматологии с помощью спектроскопии КР (СКР) и МФТ. Так же обсуждается возможность комбинированного применения СКР, МФТ и рентгеновской компьютерной томографии для мульти-модальной визуализации патологических тканей.

## II. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ

Параметр анизотропии рассеяния ( $g$ ) и коэффициент рассеяния ( $\mu_s$ ) биологических тканей определяются разницей показателей преломления ( $n$ ) клеточных компонентов этих тканей (ядер, органелл, мембран, и цитоплазмы) или склеропротеиновых волокнистых структур дермы кожи, мышечной или хрящевой ткани и межтканевой жидкостью [56]. На данный момент известны показатели преломления в видимом и

инфракрасном диапазоне длин волн для ряда биологических тканей их основных компонентов, таких как ядра и цитоплазматические органеллы в клетках млекопитающих [57], оксигенированный и неоксигенированный гемоглобин [58, 59], коллаген соединительных тканей [60] и т.д.

В настоящей работе мы ограничимся рассмотрением иммерсионного ОП, когда согласование показателей преломления в ткани достигается за счет иммерсии исследуемой ткани в ОПА. На данный момент, в научном сообществе рассматриваются три основных гипотетических механизма ОП [61]. Первый механизм заключается в уравнивании разницы между значениями показателей преломления различных компонентов биологических тканей и тканевых жидкостей за счет проникновения ОПА в ткани [34, 36, 41, 43, 61–66]. Второй механизм ОП связан с дегидратацией биологической ткани, вызванной гиперосмолярными свойствами ОПА [34, 37, 41, 62, 66–68]. Третий процесс связан с взаимодействием ОПА с процессом обратимой диссоциации коллагеновых волокон в дерме [66, 69–72], который способствует дестабилизации коллагеновой структуры путем взаимодействия водородных связей коллагена и ОПА, что в итоге приводит к уменьшению светорассеяния коллагеновых структур за счет уменьшения размера рассеивающих частиц [67, 73]. Важно отметить, что описанные механизмы ОП обычно реализуются не независимо друг от друга, а происходят совместно. Более того, относительный вклад каждого из механизмов чаще всего бывает неравнозначным и зависит от таких параметров как тип биологической ткани, молекулярный состав ОПА, его концентрация, и т. д. В ряде работ было выдвинуто предположение о том, что дегидратация, вызванная применением ОПА может уменьшать рассеяние в мягких тканях за счет вытеснения воды из областей между коллагеновыми волокнами, тем самым уменьшая разницу между значениями показателей преломления компонентов ткани [34, 44, 74, 75]. Так, например, показатель преломления воды составляет 1.33 для длины волны 590 нм, в то время как для той же длины волны показатель преломления эпидермиса человека равен 1.44, дермиса 1.39, а 70% раствора глицерина в воде и 100% Omnipaque™ – 1.43 [46, 76, 77]. В ряде работ была показана возможность чрезвычайно высокого уменьшения коэффициента рассеяния за счет ОП [36, 75, 78–81]. Более того, структурные изменения, вызванные дегидратацией приводят к сжатию биологической ткани и, как следствие, к увеличению ее прозрачности за счет интерференционных явлений при рассеянии света на упорядоченных структурах.

Таким образом, эффективность ОП биологических тканей может зависеть от множества факторов, таких как показатель преломления ОПА, его осмолярность, концентрация и т.д., а также изначальной мутности биоткани и ее проницаемости для молекул данного ОПА. Подбор оптимальных параметров ОПА является сложной и важной задачей, решение которой позволяет эффективно и неинвазивно исследовать глубокие слои биологических тканей. Также, стоит учитывать, что для *in vivo* исследований, эффективность ОП может зависеть от таких физиологических особенностей тканей как метаболическая реакция на ОПА, температура и особенности функционирования (степень кровоснабжения, наличие развитой лимфатической системы) [34, 37, 61, 65, 67, 79, 82–85]. Более того, показатели преломления компонентов живой ткани зависят от ее физиологического и патологического состояния. Стоит также учитывать, например, что инъекции глицерина и глюкозы непосредственно в кожу влияют на состояние микроциркуляции крови в дерме, причем величина данного влияния определяется концентрацией и продолжительностью действия ОПА [49, 86, 87].

### III. ОПТИЧЕСКИЕ ПРОСВЕТЛЯЮЩИЕ АГЕНТЫ И ИХ УСИЛИТЕЛИ

С момента начала использования метода ОП, было протестировано большое количество веществ и их комбинаций, ряд из которых показали свою высокую эффективность в качестве агентов для визуализации биологических тканей. Все известные на данный момент ОПА для иммерсионного применения можно условно разбить на следующие группы: 1) многоатомные спирты (глицерин, полиэтилен гликоль (ПЭГ), полипропилен гликоль, а также растворы на основе сорбитола, полипропилен гликоля, полиэтилен гликоля, ксилита и маннита [44, 68, 78–80, 82, 86–95]; 2) сахара (глюкоза, фруктоза, рибоза, сахароза и декстроза) [41, 70, 71, 84–87, 96–99]; 3) органические кислоты (олеиновая и линолевая кислоты [50, 100]); 4) прочие органические растворители, такие как ДМСО [39, 50, 66, 100, 101] или тиазон [102–108]; 5) рентгеновские контрастные агенты (Verografin™, Trasograph™, Нураque™, и Omnipaque™) [46, 48]. На данный момент, наиболее широко используемыми ОПА, особенно при просветлении кожи, являются глицерин, глюкоза и ПЭГ в силу их хорошей биосовместимости и фармакинетики относительно биологических тканей [43, 45, 62, 105, 109–111]. Данные ОПА принято рассматривать как нетоксичные. Тем не менее, чрезмерно

долгое их воздействие на живые ткани может вызывать такие негативные эффекты как локальный гемостаз и чрезмерное сжатие тканей, а в некоторых случаях даже некроз при инъекции в кожу. Было показано, что диссоциация коллагеновых волокон вызванная воздействием глицерина может привести к изменениям морфологии дермы кожи и сухожилия грызунов [71, 72]. Более того, глицерин оказывает влияние на кровеносные сосуды кожи. В частности, он вызывает венозный и артериальный застой [112]. Так же было показано, что применение таких ОПА как глюкоза и глицерин могут приводить к временной полной остановке кровотока в поверхностных сосудах [86, 87]. В ряде работ было отмечено, что некоторые ОПА могут вызывать отечность и раздражение тканей [68, 79, 81, 84, 85].

Таким образом, одной из важнейших задач для безопасной *in vivo* визуализации живых тканей является поиск оптимального ОПА, его концентрации и времени экспозиции. Недавние исследования показали, что перспективным ОПА для безопасных *in vivo* исследований является Йогексол (5-[Ацетил(2,3-дигидроксипропил)амино]-N,N'-бис(2,3-дигидроксипропил)-2,4,6-трийод-1,3-бензолдикарбоксамид) производимый под торговой маркой Omnipaque™. Растворы с концентрацией Йогексола 300 мг/мл (Omnipaque™(300)) [48, 113, 114] и 350 мг/мл (Omnipaque™(350)) [44] были успешно применены в качестве ОПА для эффективной визуализации глубоких слоев биологических тканей. Низкая осмолярность данного вещества (465 мОсм/л) позволяет избежать деформации слоев кожи. Кроме того, в сравнении с глицерином, Omnipaque™ (300) вызывает значительно меньшую дегидратацию кожи [46, 48].

Как уже было сказано выше, эффективность ОП зависит от многих факторов. Среди них тип ОПА, его концентрация, а также время, в течении которого биологическая ткань подвергается обработке агентом. Например, в некоторых случаях просветление ткани до полной прозрачности занимает несколько недель [64]. Поскольку барьерная функция рогового слоя кожи в значительной степени препятствует проникновению ОПА с высокими концентрациями в глубокие слои дермы, ОП кожи занимает большее времени по сравнению с другими типами биологических тканей. Поскольку низкие концентрации ОПА не могут обеспечить достаточно эффективного ОП, а длительное применение высококонцентрированных ОПА может вызвать негативное воздействие на кожу, были введены методы позволяющие ускорить процесс ОП.

Этанол, пропилен гликоль, ДМСО, линолевые и олеиновые кислоты широко используются в качестве химических усилителей проникающей способности для ОПА [39, 61, 66, 97, 101, 103, 104,

106–108, 111, 115–121]. Более того, ДМСО, пропилен гликоль, олеиновая кислота зачастую используются как отдельные ОПА [39, 50, 66, 91, 122–125]. Предварительная обработка кожи этанолом позволяет модифицировать свойства кожного барьера рогового слоя, а также ускорить проникновение агента через придатки кожи и непосредственно через эпидермис [95, 120]. Кроме того, этанол обезжиривает поверхность кожи, что также способствует ускоренному ОП.

Также, помимо применения химических усилителей, биологические ткани зачастую подвергают физической обработке непосредственно перед применением ОПА. Среди физических методов наиболее широко используются такие методы, как удаление поверхностных слоев рогового слоя с помощью липкой ленты (tape stripping) [126], микро-травмирование эпидермиса [127], микродермабразия [128], фототермическая и механическая перфорация [129], лазерное облучение поверхности кожи [130, 131], электрофорез [132], ультразвук [133], и т.д.

#### IV. МНОГОФОТОННАЯ ТОМОГРАФИЯ.

Многофотонная томография (МФТ) является эффективным инструментом для неинвазивного *in vivo* исследования кожи [134]. Основываясь на двух- или трех-фотонном возбуждении флуорофоров, данный метод позволяет исследовать 3D распределение флуорофоров в толстых биологических образцах. В общих чертах, подобного рода визуализация возможна за счет того, что возбуждение флуорофоров в ультрафиолетовом диапазоне, например на длине волны 380 нм, осуществляется за счет облучения исследуемой ткани фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 760 нм. Поскольку биологические ткани имеют высокую проницаемость для данной длины волны, МФТ позволяет получить изображения глубоких слоев кожи, до глубины  $\approx 200$  мкм. Сигнал автофлуоресценции, вызванный двух-фотонным возбуждением (далее автофлуоресценция (АФ)) при исследовании кожи формируется за счет NAD(P)H, эластина, меланина и в меньшей степени кератина. Сигнал же для генерации второй гармоники (ГВГ) формируется за счет отклика молекул коллагена I типа. Как правило, в МФТ, для возбуждения сигнала используются длины волн большие чем длины волн самих излучаемых сигналов АФ и ГВГ. Основным недостатком МФТ заключается в том, что сильное рассеяние в биологических тканях критически снижает глубину проникновения жестко сфокусированного лазерного излучения до глубин даже меньших, чем для эквивалентной однофотонной флуоресцентной микроскопии [135].

Таким образом, применение ОПА при работе с биологическими объектами может быть полезным инструментом, значительно увеличивающим возможности данного нелинейно-оптического метода визуализации.

Результаты изучения одного из механизмов ОП представлены в работе [72], где авторы предложили молекулярный механизм ОП. Данное предположение было основано на том факте, что насыщение дермы и хвостового сухожилия грызунов обезвоженным (100%) глицерином привело к последующей временной и обратимой потере организации фибрилл в этих тканях. Такого рода изменения в организации коллагеновых структур, а также уменьшение их диаметра, может приводить к снижению рассеяния в биологических тканях.

Исследование возможности увеличения глубины визуализации с помощью двухфотонной томографии (ДФТ) путем применения ОПА было впервые описано в работе Чиччи и др. [45]. В данной работе, дерма кожи человека подвергалась воздействию гиперосмотических агентов (глюкоза, глицерин и полипропилен гликоль) в течении нескольких минут. В результате проведенных исследований глицерин проявил себя как наиболее эффективный, но, в тоже время, наиболее медленный ОПА (относительный контраст для него составил 16.3 на глубине 20 мкм). Близким к глицерину по эффективности показал себя раствор пропилен гликоля (для него относительный контраст составил 12.6 на глубине 20 мкм). Наименее же эффективным оказалось воздействие глюкозы (при относительном контрасте 5.1 на глубине 20 мкм). Тем не менее, было обнаружено что процесс ОП при применении глюкозы происходит в три раза быстрее чем при применении глицерина.

В работе [135] было показано, что мультимодальный подход, комбинирующий одновременное использование конфокальной и ДФТ с последующей 3-D визуализацией может обеспечить неинвазивное исследование коллагеновых структур. В данной работе авторы использовали смесь из ДМСО, диатризоатной кислоты и глюкомина в качестве ОПА. Описанная смесь широко известна как FocusClear и была запатентована в 2002 [136]. Более того, в [135] было показано, что в сравнении с чистым ДМСО и глицерином, FocusClear обеспечивает в значительной степени лучшее пропускание на 488, 543 и 633 нм, и более интенсивное флуоресцентное излучение на 505 нм. Кроме того, комбинированное использование двух-фотонной томографии и флуоресцентной микроскопии позволило присвоить уникальные морфологические и спектроскопические характеристики различным составляющим кожи человека [137]. Наиболее важно то, что в данной работе было показано, что полученные данные позво-

ляют отличить здоровые участки кожи от тканей с меланомой и базально-клеточной карциномой. Была также продемонстрирована возможность диагностировать и различать плоскоклеточный рак и предшествующий ему актинический кератоз по полученным с помощью МФТ морфологическим параметрам эпидермиса *in vivo* не используя ОП [138].

В работе [139] было показано, что использование МФТ позволяет разделить по времени процессы, происходящие во время воздействия глицерина на ткани, содержащие коллагеновые структуры. Было выяснено, что первый процесс – это быстрая дегидратация ткани, сопровождаемая сжатием коллагеновых структур. Второй процесс – это процесс относительно медленного проникновения ОПА в межфибрилярное пространство коллагена. В ходе исследований также было выяснено, что использование растворов глицерина с низкой концентрацией вызывает значительно меньший эффект ОП. Было предположено, что это связано с тем фактом, что в процессе ОП молекулы воды в ткани частично заменяются молекулами глицерина, поэтому чем больше молекул глицерина в ОПА, тем эффективнее ОП. Также авторы показали, что эффекты, вызванные применением 100% глицерина и фосфатного буферного раствора смешанного с глицерином (50% / 50%) в течении нескольких минут, являются обратимыми.

В работе [68] было продемонстрировано, что применение глицерина в качестве ОПА приводит к снижению коэффициента диффузного отражения кожи крысы *in vivo*. Кроме того, обработка кожи 75%-раствором глицерина в течении 30 мин позволило просветлить кожу до состояния прозрачности. Данному процессу также сопутствовало уменьшение толщины дермы с 1459 мкм до 1287 мкм и уменьшение диаметра коллагеновых волокон с 109 нм до 79 нм за счет вытеснения воды из ткани, вызванного применением глицерина. Тем не менее, коллагеновые волокна не обрывались и не растворялись в ходе эксперимента. В связи с этим фактом, авторы сделали предположение о том, что один из важнейших механизмов ОП связан с изменением толщины (сжатием) слоя ткани и сопутствующей более плотной и регулярной упаковкой волокон и уменьшением диаметра волокон за счет дегидратации межфибрилярного вещества и самих коллагеновых волокон.

Важно отметить, что уменьшение рассеяния в следствии ОП эффективно помогает выходу флуоресценции до тех пор, пока фронт просветления не дойдет до изучаемых флуорофоров. Поскольку в отсутствии рассеяния полная длина пути фотона, возбуждающего флуоресценцию, уменьшается, то снижается и вероятность встретить

флуорофор и вызвать его возбуждение. Тем не менее, в случае его возбуждения, он с большой вероятностью дойдет до детектора в следствии малого рассеяния. Таким образом, нужно учитывать, что чрезмерно сильное ОП приводит к потере сигнала [140].

С целью изучения возможности применения метода *in vivo* нами были проведены исследования эффективности ОП на свиной коже после ее краткой обработки биологически совместимыми агентами такими, как глицерин или йогексол (Omnipaque™(300)) [46]. Было показано, что применение обоих ОПА в течении 1 часа, что является приемлемым для *in vivo* применений, может значительно улучшить глубину визуализации и контраст АФ и ГВГ изображений. Пример АФ изображений для различных глубин представлен на рисунке 1 для контрольного образца кожи и образцов обработанных 60% и 100% растворами глицерина и 100% раствором Omnipaque™(300). В ходе исследований были успешно сравнены эффекты ОП для 40%, 60% и 100% растворов глицерина и 60% и 100% растворов Omnipaque™(300). Нами было обнаружено, что 100% раствор глицерина оказывает меньший эффект на интенсивность ГВГ сигнала чем растворы с концентрацией 40% и 60%, что было естественно связать с большей вязкостью высоко-концентрированного раствора глицерина, препятствующей его проникновению в кожу. Кроме того, более сильная дегидратация ткани в этом случае, также могла способствовать несколько меньшей эффективности. Несмотря на то, что оба агента обеспечивают значительное ОП, глицерин проявил себя как более эффективный агент, хотя за счет сильной дегидратации ткани вызывал сжатие тканей кожи и изменение клеточной морфологии. Для растворов Omnipaque™(300) подобных эффектов не наблюдалось, в связи с чем нами было выдвинуто предположение о его потенциальной высокой эффективности в качестве безопасного и быстродействующего ОПА для клинических измерений.

## V. СПЕКТРОСКОПИЯ КР

В основе спектроскопии КР (СКР) лежит детектирование неупругого рассеянного света, при обмене колебательной и вращательной энергий между зондирующим излучением и молекулами облучаемого образца. КР спектр биологической ткани можно назвать его молекулярным отпечатком содержащим информацию о химическом составе. Любые незначительные изменения в клетках и тканях могут приводить к сильным изменениям в спектре КР. Таким образом, СКР является удобной техникой позволяющей измерять химический состав различных типов биологических тканей [141–143]. СКР и

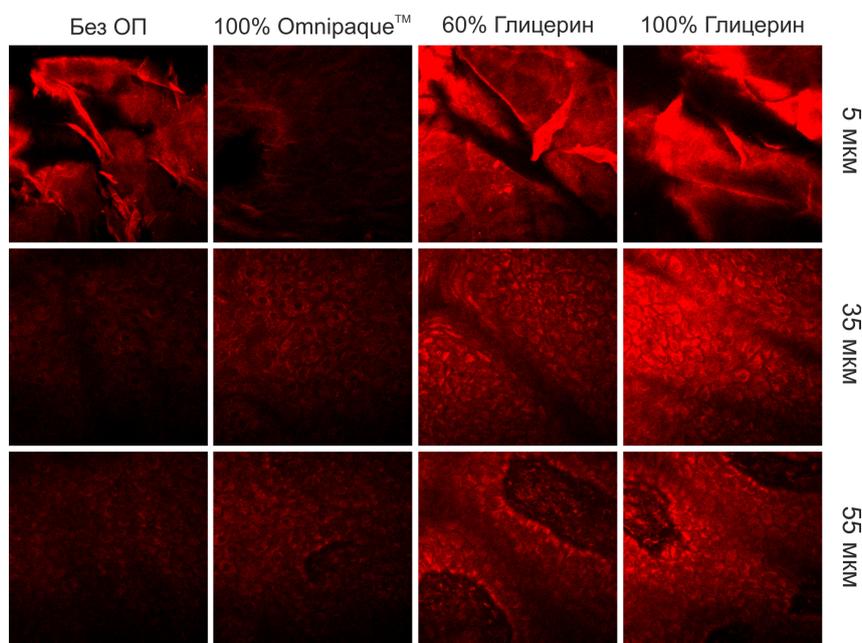


Рис. 1. Изображения автофлуоресценции контрольного образца и образцов свиной кожи, обработанных 60% и 100% растворами глицерина и 100% раствором Омнираке™ (300), полученные *ex vivo* на различных глубинах. Длина волны возбуждения 760 нм.

микроскопия КР (МКР) интенсивно используются в дерматологии для *in vivo* анализа эпидермиса (в большей степени рогового слоя) кожи [144–147]. Также СКР активно используется для мониторинга проникновения ксенобиотиков в кожу [148–150]. Тем не менее, за счет сильного рассеяния света кожей, СКР имеет строгое ограничение для *in vivo* измерений (допустимые глубины как правило ограничены толщиной эпидермиса, т.е. глубиной  $\approx 40$ –50 мкм). Поскольку процессу ОП должно сопутствовать уменьшение упругого рассеяния света, это позволяет достичь более эффективного взаимодействия зондирующего лазерного пучка с исследуемыми тканями. Таким образом, применение ОП совместно с СКР позволяет значительно улучшить качество клинических измерений.

В своей работе, Энейдер и др. [151] предоставил результаты измерений спектров КР при различных концентрациях глюкозы у добровольцев не страдающих диабетом. Для данного эксперимента был использован пероральный глюкозотолерантный тест. Для простоты

предоставления и сравнения результатов измерений учеными было принято использовать спектральную область между 400 и 2000 см<sup>-1</sup> при возбуждении на 785 нм. Различные колебания молекул приводят к возникновению сигнала КР в данной области волновых чисел. В большинстве случаев пики КР соответствуют конкретным молекулярным колебаниям или типам молекул, что позволяет получить информацию о биохимическом составе исследуемой биологической ткани [152, 153]. В работе [117] была показана возможность мониторинга проникновения и распределения ОПА в коже человека за счет уникальных свойств спектра КР используемого агента. В качестве ОПА использовался ДМСО. В ходе исследований было установлено, что основная часть раствора проникала через роговой слой кожи в течении 20 мин.

Важным открытием стало то, что применение ОПА может увеличить отношение сигнал/шум, а также в значительной степени усилить сигнал КР и уменьшить систематическую ошибку, которая может возникнуть из-за неточного определения поверхностных и суб-поверхностных спектров [152].

В работе [154] был описан мульти-модальный подход комбинирующий МФТ (в частности используя сигнал ГВГ) и КАСКР – когерентная антистоксова спектроскопия КР для исследования эффекта ОП вызываемого применением ДМСО на кожу человека. На основании своих исследований авторы высказали предположение о том, что ДМСО взаимодействует с коллагеновыми волокнами, изменяя межфибрилярное расстояние в субмикронном масштабе. Было показано, что рассеяние кожи уменьшалось при применении 40% водного раствора ДМСО, в то время как для более низких концентраций (20%), значение рассеяния оставалось неизменным. Таким образом, данная работа стала важным подтверждением того, что механизмы согласования показателей преломления компонентов тканей и структурные изменения коллагеновых волокон играют значительную роль в процессе ОП. Кроме того, было показано, что концентрация ДМСО меняется со временем на различной глубине кожи, что позволило определить коэффициент диффузии ДМСО в коже. Максимальная концентрация раствора ДМСО уменьшилась с 40% до 10% на глубине 25 мкм (эпидермис) в течении 3 часов. Данное снижение сопровождалось дегидратацией кожного покрова и уменьшением барьерной функции рогового слоя. Данная работа показала, что КАСКР может быть эффективным методом для численного анализа процессов ОП.

В работе [155] представлены исследования ОП свиной кожи при местной аппликации раствора глицерина с водой (40%, 60% и

80%) на интервале времени от 0 до 75 мин. Авторы показали, что применение глицерина позволяет в значительной степени увеличить глубину детектирования спектров КР. Также было показано, что увеличение концентрации глицерина 40% до 80% приводит к более эффективному ОП.

Ким и др. экспериментально показали, что спектр КР свиной кожи зависит от содержания в ней воды. В частности, было показано, что соотношение пиков протеина на  $1450\text{ см}^{-1}$  и  $1660\text{ см}^{-1}$  значительно отличается для кожи с 40%, 45%, 50% и 55% содержанием воды [156]. Этот факт был подтвержден при моделировании процесса методом Монте-Карло. Увеличение содержания воды в большей степени приводит к распределению обратного рассеяния в большей угловой области, нежели чем к увеличению его интенсивности. Таким образом авторы предположили, что для точной диагностики кожных заболеваний с использованием КР нужно контролировать содержание воды в коже во время измерений. Подробный сравнительный анализ распределения концентрации воды в роговом слое в зависимости от силы водородных связей для свиной кожи *ex vivo* и кожи человека *in vivo* приведен в работе [157].

Поскольку сигнал КР очень сильно зависит от наличия упругого рассеяния [158, 159], то необходимо учитывать тот факт, что применение высококонцентрированных ОПА способно настолько сильно снизить рассеяние, что может привести к потере сигнала КР. По этой причине, при измерениях в условиях ОП необходимо искать компромисс между усилением сигнала КР при сильном рассеянии исследуемой ткани и потерей сигнала КР при его отсутствии [158, 160]. Таким образом, для измерений КР на живых тканях важно найти биосовместимый ОПА, оптимизировать его концентрацию и длительность воздействия, так чтобы сигнал КР с заданной глубины имел максимальное значение.

Поскольку сильное рассеяние биологических тканей и слабая интенсивность КР в значительной степени уменьшают разрешение и контраст спектров КР, то получили развитие методы на основе гигантского КР (ГКР) [161–165], позволяющие значительно увеличить чувствительность измерений КР в коже. В работе [166] была показана возможность дальнейшего повышения чувствительности ГКР при исследованиях кожи мыши с помощью применения ряда ОПА. Наибольшую эффективность показал агент ФПТ, представляющий собой смесь фруктозы, ПЭГ-400 и тиазона. Максимальный эффект был зафиксирован через 15 мин после применения и был в 3.5 раза больше, чем после применения раствора фруктозы.

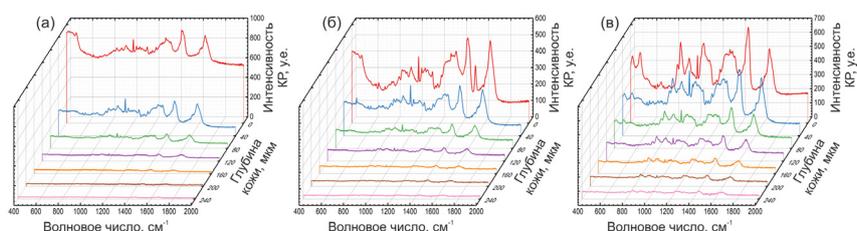


Рис. 2. Спектры КР, полученные *ex vivo* на различных глубинах для контрольного образца свиной кожи (а); образца кожи, обработанного 100% раствором Omnipaque™ (300) в течение 1 часа (б); образца кожи, обработанного 70% раствором глицерина в течение 1 часа (в). Длина волны возбуждения 785 нм.

В недавней работе Дарвина и соавт. [167], был представлен *in vivo* метод определения различных типов чернил в татуированной коже при использовании микроскопии КР в комбинации с оптическим просветлением глицерином, что позволило увеличить глубину зондирования с 50 до 400 мкм.

В недавней работе нами было изучено действие 70% раствора глицерина и 100% раствора Omnipaque™(300) в течение 30 и 60 мин на образцы свиной кожи [48]. На рис. 2 представлены примеры полученных спектров КР в диапазоне волновых чисел 400–2000  $\text{см}^{-1}$  на различных глубинах для контрольного образца и образцов, обработанных раствором глицерина и Omnipaque™(300). Мы показали, что интенсивность пиков КР, соответствующих молекулярным компонентам кожи, значительно увеличилась на глубинах более 160 мкм после 60 мин действия Omnipaque™(300). Для глицерина, увеличение пиков было заметно уже начиная с глубины 40 мкм. Нами было проведено исследование влияния ОПА на гидратацию коллагена в дерме. Было установлено, что оба ОПА так или иначе вызывали дегидратацию кожи. Тем не менее, Omnipaque™(300) оказывал в значительной степени меньший эффект. Для лучшего понимания влияния ОПА на содержание воды в коже нами были дополнительно проанализированы спектры КР в диапазоне волновых чисел 2000–4000  $\text{см}^{-1}$ . Для каждого спектра КР была проведена процедура деконволюции с использованием 10 функций Гаусса. Данная процедура подробно описана в работе [168]. Далее, для анализа состава воды, в зависимости от силы водородных связей, нами были выбраны 4 функции Гаусса центрированные на 3005, 3277, 3458 и 3604  $\text{см}^{-1}$ . Данные пики соответствуют 4 типам воды содержащимся в коже: 3005  $\text{см}^{-1}$  – жестко связанная вода (DAA–ОН:

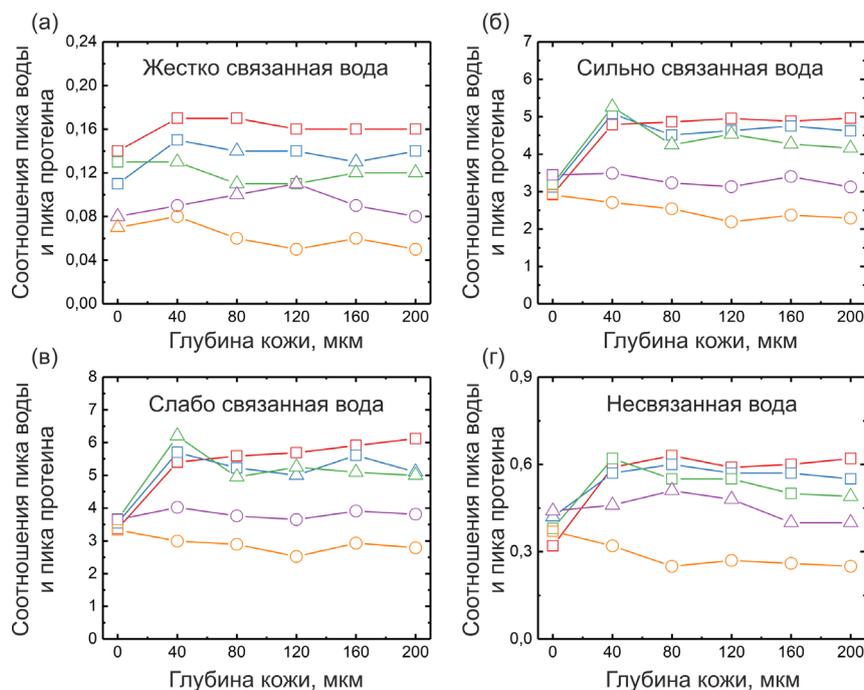


Рис. 3. Значение пиков жестко связанной (а), сильно связанной (б), слабо связанной (в) и несвязанной (г) воды нормированной на пик протеина для разных глубин в свиной коже *ex vivo*.

Красный цвет – кожа без ОП. Синий цвет – кожа после 30 мин применения *Optiraque*<sup>TM</sup>(300). Зеленый цвет – кожа после 60 мин применения *Optiraque*<sup>TM</sup>(300). Фиолетовый цвет – кожа после 30 мин применения глицерина. Оранжевый цвет – кожа после 60 мин применения глицерина. На графике представлены средние значения. Квадрат соответствует незначительному различию между контрольным образцом и образцом обработанным ОПА при  $p > 0.05$ . Треугольник соответствует значительному различию между контрольным образцом и образцом обработанным ОПА при  $p < 0.05$ . Круг соответствует значительному различию между контрольным образцом и образцом обработанным ОПА при  $p < 0.01$ .

один донор, два акцептора);  $3277\text{ см}^{-1}$  – сильно связанная вода (DDAA–ОН: два донора, два акцептора);  $3458\text{ см}^{-1}$  – слабо связанная вода (DA–ОН: один донор, один акцептор);  $3604\text{ см}^{-1}$  – несвязанная вода (суперпозиция очень слабо связанной воды DDA–ОН: два донора, один акцептор и свободной воды). Далее рассчитывались площади под кривой для каждой из этих функций Гаусса. Полученные значения нормировались на значение площади под кривой для функции Гаусса центрированной на  $2930\text{ см}^{-1}$  (протеины, [169]).

Результаты проведенных вычислений для образцов обработанных в течении 30 и 60 мин 70% раствором глицерина и 100% раствором Omnipaque™(300) на различных глубинах представлены на рис. 3. Также на рис. 3 приведены контрольные данные, полученные на коже не подвергавшейся обработке ОПА.

Из рисунка 3а видно, что содержание жестко связанной воды падает после применения обоих просветляющих агентов. Тем не менее, глицерин оказывает в значительной степени больший эффект, чем Omnipaque™(300). Из рисунка 3б видно, что Omnipaque™(300) вызывает значительное снижение сильно связанной воды только после 60 мин применения на глубинах 80–200 мкм. Глицерин оказывает намного большее влияние начиная с глубины 40 мкм. Важно отметить рост сильно связанной и слабо связанной воды на глубине 40 мкм при 30 и 60 мин воздействия Omnipaque™(300). Так же, подобный эффект виден для несвязанной воды после 60 мин применения Omnipaque™(300). Данные результаты подробно представлены в недавней работе авторов [170]. Поскольку Omnipaque™(300) проникает в глубины 35–40 мкм в течении 1 часа взаимодействия, данный рост может быть связан с тем что вода, содержащаяся в растворе Omnipaque™(300) дополняет содержащуюся в коже воду. Другим объяснением может являться тот факт, что нормировка на пик протеинов для глубины 40 мкм не совсем корректна, поскольку глубина 40 мкм соответствует шиповатому слою, в котором наблюдается относительный дефицит протеина по сравнению с роговым слоем и дермой [171]. Из рисунка 3в видно, что применение обоих ОПА в целом оказывает схожие изменения на слабо связанную и сильно связанную типы воды. Из рисунка 3г видно, что применение глицерина уменьшает содержание несвязанной воды начиная с глубины 40 мкм. Omnipaque™(300) оказывает значительное влияние только после часового воздействия начиная с глубины 80 мкм. В целом, оба ОПА оказали наибольшее воздействие на сильно связанную и слабо связанную типы воды кожи. Полученные данные показали, что применение глицерина оказывает в значительной степени большую дегидратацию кожного покрова, чем применение Omnipaque™(300). Данный вывод хорошо коррелирует с нашими предыдущими исследованиями [48] и в очередной раз подтверждает перспективность использования Omnipaque™(300) для клинических измерений. Также с его помощью возможна количественная оценка эффекта оказываемого ОПА на отдельные компоненты кожи, например, коллаген. Более того, возможен мониторинг перемещения потоков жидкостей, вызванных применением ОПА.

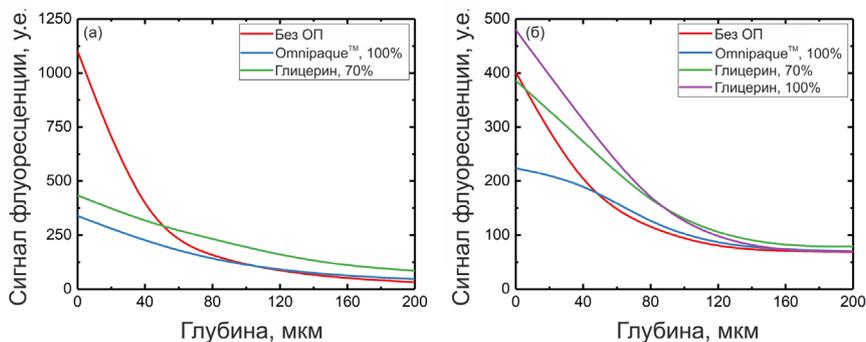


Рис. 4. Значение фоновой флуоресценции спектров КР (длина волны возбуждения 785 нм) для образцов кожи, обработанных 70% раствором глицерина, 100% раствором Омнираке™ и контрольных образцов (а); значение флуоресценции МФТ (длина волны возбуждения 760 нм) для образцов кожи обработанных 70% и 100% растворами глицерина, 100% раствором Омнираке™ и контрольных образцов (б).

Используя метод МФТ, нами также было изучено влияние ОПА на флуоресценцию свиной кожи [46]. На рис. 4 представлены для сравнения данные для МКР (рис. 4а) и МФТ (рис. 4б). Для МКР флуоресценция рассчитывалась как интегральное значение фоновой флуоресценции. Для МФТ брался сигнал АФ.

Из рисунка 4а видно, что применение обоих ОПА приводит к значительному снижению фоновой флуоресценции на глубинах до 50 мкм за счет иммерсии ОПА. На больших глубинах фоновая флуоресценция для образцов, обработанных Омнираке™(300) сравнима с флуоресценцией для контрольных образцов, в то время как применение глицерина вызывает рост фоновой флуоресценции. Данный эффект для глицерина связан с тем, что больше возбуждающего света попадает к глубоко лежащим флуорофорам за счет снижения рассеяния, в следствии чего выход наружу флуоресценции также выше за счет снижения рассеяния. Из рисунка 4б видно, что применение Омнираке™(300) также вызывает значительное снижение сигнала АФ на глубинах (до 50 мкм) за счет иммерсии ОПА. На глубинах 50–160 мкм сигнал АФ для образцов, обработанных Омнираке™(300), несколько больше, чем для контрольных образцов. На глубинах более 160 мкм их значение сравнивается. Важно отметить, что обработка кожи 60% раствором глицерина приводит к увеличению сигнала АФ по сравнению с контрольными образцами на всех глубинах за исключением поверхности кожи. Применение 100% раствора глицерина также приводит к росту сигнала АФ вплоть до глубины

160 мкм. Подобный эффект оказываемый глицерином, возможно, возникает за счет уменьшения рассеяния за счет сильной дегидратации кожного покрова.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что Omnipaque™(300) является крайне эффективным ОПА. Помимо того, что он вызывает в значительной степени меньшую дегидратацию по сравнению с глицерином, он сильнее снижает фоновую флуоресценцию в верхних слоях кожи, которая является конкурирующим эффектом в МКР. Более того, поскольку Omnipaque™(300) является рентгеновским контрастным агентом, это потенциально позволяет использовать его для мульти-модальной визуализации, комбинирующей оптические методы и микро-рентгеновскую визуализацию кожи.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптическое просветление является эффективным методом для контроля оптических свойств исследуемого биологического объекта, что позволяет увеличить глубину зондирования с помощью оптических систем, а также улучшить качество получаемой информации. Поиск новых безопасных и эффективных оптических агентов и изучение методов их воздействия на биологические ткани остается актуальной задачей. В данной работе приведен краткий обзор результатов исследований по воздействию оптического просветления на улучшение качества оптической диагностики в дерматологии с акцентом на микроскопию КР и МФТ кожи. Так же приведены результаты исследования воздействия глицерина и Omnipaque™(300) на жестко связанную, сильно связанную, слабо связанную и несвязанную воду. В частности, было показано, что применение обоих ОПА оказывает наибольшее влияние на сильно связанную и слабо связанную воду. Тем не менее, глицерин оказывает в значительной степени больший дегидратационный эффект, чем Omnipaque™(300). Так же приведены исследования влияния этих ОПА на флуоресценцию в МКР и МФТ. На основе полученных данных был сделан вывод о том, что Omnipaque™(300) является крайне эффективным ОПА, способным в значительной мере снизить фоновую флуоресценцию в верхних слоях кожи.

Помимо КР и МФТ существует большое количество оптических методов для исследования биологических тканей на молекулярном уровне, которые теряют эффективность при сильном рассеянии. При этом многие биологические ткани до сих пор остаются малоизученными в контексте оптического просветления, особенно в условиях

*in vivo*. Все это открывает большое поле для дальнейших мульти-модальных исследований и поиска новых методик визуализации биологических тканей и анализа их параметров, совмещенных с контролируемым оптическим просветлением.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Agache, P., Humbert, P. (2004). Measuring the skin. Springer Science Business Media, 709 p.
2. Potts, R. (1997). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. *Archives of Dermatology*, **133**, 924–924.
3. Yokota, M., Tokudome, Y. (2016) The Effect of Glycation on Epidermal Lipid Content, Its Metabolism and Change in Barrier Function. *Skin Pharmacology and Physiology*, **29**, 231–242.
4. Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M. (2008) The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, **17**, 1063–1072.
5. van Smeden, J., Janssens, M., Kaye, E.C., Caspers, P.J., Lavrijsen, A.P., Vreeken, R.J., Bouwstra, J.A. (2014) The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Experimental Dermatology*, **23**, 45–52.
6. Fercher, A.F. (1996) Optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, **1**, 157–173.
7. Gambichler, T., Pljakic, A., Schmitz, L. (2015) Recent advances in clinical application of optical coherence tomography of human skin. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, **8**, 345–354.
8. Darvin, M.E., Gersonde, I., Albrecht, H., Gonchukov, S.A., Sterry, W., Lademann, J. (2005) Determination of beta carotene and lycopene concentrations in human skin using resonance Raman spectroscopy. *Laser Phys.*, **15**, 295–299.
9. Vyumvuhore, R., Tfayli, A., Piot, O., Le Guillou, M., Guichard, N., Manfait, M., Baillet-Guffroy, A. (2014) Raman spectroscopy: in vivo quick response code of skin physiological status. *Journal of Biomedical Optics*, **19**, 111603.
10. Krafft, C., Popp, J. (2015) The many facets of Raman spectroscopy for biomedical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **407**, 699–717.
11. Choe, C., Lademann, J., Darvin, M.E. (2016) A depth-dependent profile of the lipid conformation and lateral packing order of the stratum corneum in vivo measured using Raman microscopy. *The Analyst*, **141**, 1981–1987.
12. Darvin, M.E., Sterry, W., Lademann, J., Vergou, T. (2011) The Role of Carotenoids in Human Skin. *Molecules*, **16**, 10491–10506.
13. Konig, K., Riemann, I. (2003) High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics*, **8**, 432–439.
14. Balu, M., Mikami, H., Hou, J., Potma, E.O., Tromberg, B.J. (2016) Rapid mesoscale multiphoton microscopy of human skin. *Biomed. Opt. Express*, **7**, 4375–4387.
15. Shirshin, E.A., Gurfinkel, Y.I., Priezhnev, A.V., Fadeev, V.V., Lademann, J., Darvin, M.E. (2017) Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization. *Sci. Rep.*, **7**, 1171.
16. Shirshin, E.A., Gurfinkel, Y.I., Matkeplishvili, S.T., Sasonko, M.L., Ome-lyanenko, N.P., Yakimov, B.P., Lademann, J., Darvin, M.E. (2018) In vivo optical imaging of the viable epidermis around the nailfold capillaries for the assessment of heart failure severity in humans. *Journal of Biophotonics*, **11**, e201800066.
17. Abookasis, D., Moshe, T. (2014) Feasibility study of hidden flow imaging

- based on laser speckle technique using multiperspectives contrast images. *Opt. Laser Eng.*, **62**, 38–45.
18. Sdobnov, A., Bykov, A., Molodij, G., Kalchenko, V., Jarvinen, T., Popov, A., Kordas, K., Meglinski, I. (2018) Speckle dynamics under ergodicity breaking. *J. Phys. D-Appl. Phys.*, **51**, 155401.
  19. Ferulova, I., Lihachev, A., Spigulis, J. (2015) Photobleaching effects on in vivo skin autofluorescence lifetime. *Journal of Biomedical Optics*, **20**, 051031.
  20. Maciel, V.H., Correr, W.R., Kurachi, C., Bagnato, V.S., da Silva Souza, C. (2017) Fluorescence spectroscopy as a tool to in vivo discrimination of distinctive skin disorders. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **19**, 45–50.
  21. Lademann, J., Patzelt, A., Darvin, M., Richter, H., Antoniou, C., Sterry, W., Koch, S. (2008) Application of optical non-invasive methods in skin physiology. *Laser Phys. Lett.*, **5**, 335–346.
  22. Ulrich, M., Klemp, M., Darvin, M.E., Konig, K., Lademann, J., Meinke, M.C. (2013) In vivo detection of basal cell carcinoma: comparison of a reflectance confocal microscope and a multiphoton tomograph. *Journal of Biomedical Optics*, **18**, 61229.
  23. Дарвин М.Е., Рихтер Х., Жу И.Д., Майнке М.К., Кнорр Ф., Гончуков С.А., ... Ладеман Ю. (2014). Сравнение возможностей лазерной сканирующей микроскопии и многофотонной томографии для визуализации кожи человека in vivo и свиной кожи ex vivo. *Квантовая электроника*, **44**, 646–651.
  24. Marti-Bonmati, L., Sopena, R., Bartumeus, P., Sopena, P. (2010) Multimodality imaging techniques. *Contrast Media Mol. Imaging*, **5**, 180–189.
  25. Chen, Z., Rank, E., Meiburger, K.M., Sinz, C., Hodul, A., Zhang, E., Hoover, E., Minneman, M., Ensher, J., Beard, P.C., Kittler, H., Leitgeb, R.A., Drexler, W., Liu, M.Y. (2017) Non-invasive multimodal optical coherence and photoacoustic tomography for human skin imaging. *Scientific reports*, **7**, 17975.
  26. Konig, K., Speicher, M., Buckle, R., Reckfort, J., McKenzie, G., Welzel, J., Koehler, M.J., Elsner, P., Kaatz, M. (2009) Clinical optical coherence tomography combined with multiphoton tomography of patients with skin diseases. *Journal of Biophotonics*, **2**, 389–397.
  27. Fan, B., Neel, V.A., Yaroslavsky, A.N. (2017) Multimodal Imaging for Non-melanoma Skin Cancer Margin Delineation. *Laser Surg. Med.*, **49**, 319–326.
  28. Peng, T., Xie, H., Ding, Y.C., Wang, W.C., Li, Z.M., Jin, D.Y., Tang, Y.H., Ren, Q.S., Xi, P. (2012) CRAFT: Multimodality confocal skin imaging for early cancer diagnosis. *Journal of Biophotonics*, **5**, 469–476.
  29. Konig, K., Raphael, A.P., Lin, L., Grice, J.E., Soyer, H.P., Breunig, H.G., Roberts, M.S., Prow, T.W. (2011) Applications of multiphoton tomographs and femtosecond laser nanoprocessing microscopes in drug delivery research. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **63**, 388–404.
  30. Patalay, R., Talbot, C., Alexandrov, Y., Munro, I., Neil, M.A.A., Konig, K., French, P.M.W., Chu, A., Stamp, G.W., Dunsby, C. (2011) Quantification of cellular autofluorescence of human skin using multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging in two spectral detection channels. *Biomed. Opt. Express*, **2**, 3295–3308.
  31. Darvin, M.E., Konig, K., Kellner-Hoefer, M., Breunig, H.G., Werncke, W., Meinke, M.C., Patzelt, A., Sterry, W., Lademann, J. (2012) Safety Assessment by Multiphoton Fluorescence/Second Harmonic Generation/Hyper-Rayleigh Scattering Tomography of ZnO Nanoparticles Used in Cosmetic Products. *Skin Pharmacology and Physiology*, **25**, 219–226.
  32. Sanchez, W.Y., Obispo, C., Ryan, E., Grice, J.E., Roberts, M.S. (2013) Changes in the redox state and endogenous fluorescence of in vivo human skin due to intrinsic and photo-aging, measured by multiphoton tomography with fluorescence lifetime imaging. *Journal of Biomedical Optics*, **18**, # 061217.

33. Breunig, H.G., Weinigel, M., Buckle, R., Kellner-Hofer, M., Lademann, J., Darvin, M.E., Sterry, W., König, K. (2013) Clinical coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton tomography of human skin with a femtosecond laser and photonic crystal fiber. *Laser Phys. Lett.*, **10**, 025604.
34. Tuchin, V.V. (2015) Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis, *SPIE Press Monograph*, **PM166**.
35. Gratton, E. (2011) Deeper Tissue Imaging with Total Detection. *Science*, **331**, 1016–1017.
36. Tuchin, V.V., Maksimova, I.L., Zimnyakov, D.A., Kon, I.L., Mavlyutov, A.H., Mishin, A.A. (1997) Light propagation in tissues with controlled optical properties. *Journal of Biomedical Optics*, **2**, 401–417.
37. Tuchin, V.V. (2006) Optical Clearing of Tissues and Blood. *SPIE Press Monograph*, **PM154**.
38. Sdobnov, A.Y., Darvin, M.E., Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Lademann, J., Tuchin, V.V. (2018) Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **197**, 216–229.
39. Jiang, J., Boese, M., Turner, P., Wang, R.K. (2008) Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *Journal of Biomedical Optics*, **13**, 021105.
40. Ларин К.В., Тучин В.В. (2008) Функциональная визуализация и оценка скорости диффузии глюкозы в эпителиальных тканях с помощью оптической когерентной томографии. *Квантовая электроника*, **38**, 551–556.
41. Tuchina, D.K., Shi, R., Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Zhu, D., Luo, Q., Tuchin, V.V. (2015) Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin. *Journal of Biophotonics*, **8**, 332–346.
42. Bui, A.K., McClure, R.A., Chang, J., Stoianovici, C., Hirshburg, J., Yeh, A.T., Choi, B. (2009). Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, **41**, 142–148.
43. Tuchin, V.V., Xu, X.Q., Wang, R.K. (2002) Dynamic optical coherence tomography in studies of optical clearing, sedimentation, and aggregation of immersed blood. *Appl. Optics*, **41**, 258–271.
44. Bykov, A., Hautala, T., Kinnunen, M., Popov, A., Karhula, S., Saarakkala, S., Nieminen, M.T., Tuchin, V., Meglinski, I. (2016) Imaging of subchondral bone by optical coherence tomography upon optical clearing of articular cartilage. *Journal of Biophotonics*, **9**, 270–275.
45. Cicchi, R., Pavone, F.S., Massi, D., Sampson, D.D. (2005) Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents. *Opt. Express*, **13**, 2337–2344.
46. Sdobnov, A., Darvin, M.E., Lademann, J., Tuchin, V. (2017) A comparative study of ex vivo skin optical clearing using two-photon microscopy. *Journal of Biophotonics*, **10**, 1115–1123.
47. Schulmerich, M. V., Cole, J. H., Dooley, K. A., Morris, M. D., Kreider, J. M., Goldstein, S. A. (2008) Optical clearing in transcutaneous Raman spectroscopy of murine cortical bone tissue. *Journal of Biomedical Optics*, **13**, 021108.
48. Sdobnov, A.Y., Tuchin, V.V., Lademann, J., Darvin, M.E. (2017) Confocal Raman microscopy supported by optical clearing treatment of the skin-influence on collagen hydration. *J. Phys. D-Appl. Phys.*, **50**, 285401.
49. Liopo, A., Su, R., Tsyboulski, D.A., Oraevsky, A.A. (2016) Optical clearing of skin enhanced with hyaluronic acid for increased contrast of optoacoustic imaging. *Journal of Biomedical Optics*, **21**, 081208.
50. Liu, Y.Y., Yang, X.Q., Zhu, D., Shi, R., Luo, Q.M. (2013) Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime. *Opt. Lett.*, **38**, 4236–4239.
51. Zhao, Q.L., Li, L., Li, Q., Jiang, X., Ren, Q.S., Chai, X.Y., Zhou, C.Q.

- (2014) Concentration dependence of optical clearing on the enhancement of laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy imaging. *Journal of Biomedical Optics*, **19**, 036019.
52. Zhou, Y., Yao, J.J., Wang, L.H.V. (2013) Optical clearing-aided photoacoustic microscopy with enhanced resolution and imaging depth. *Opt. Lett.*, **38**, 2592–2595.
  53. Yang, X.Q., Liu, Y.Y., Zhu, D., Shi, R., Luo, Q.M. (2014) Dynamic monitoring of optical clearing of skin using photoacoustic microscopy and ultrasonography. *Opt. Express*, **22**, 1094–1104.
  54. Yang, X.Q., Zhang, Y., Zhao, K., Zhao, Y.J., Liu, Y.Y., Gong, H., Luo, Q.M., Zhu, D. (2016) Skull Optical Clearing Solution for Enhancing Ultrasonic and Photoacoustic Imaging. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, **35**, 1903–1906.
  55. Menyayev, Y.A., Nedosekin, D.A., Sari-mollaoglu, M., Juratli, M.A., Galanzha, E.I., Tuchin, V.V., Zharov, V.P. (2013) Optical clearing in photoacoustic flow cytometry. *Biomed. Opt. Express*, **4**, 3030–3041.
  56. Tuchin, V.V., Wang, L., Zimnyakov, D.A. (2006) Optical polarization in biomedical applications. Springer Science and Business Media. 279 p.
  57. Drezek, R., Dunn, A., Richards-Kortum, R. (1999) Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Appl. Optics*, **38**, 3651–3661.
  58. Friebel, M., Meinke, M. (2006) Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration. *Appl. Optics*, **45**, 2838–2842.
  59. Lazareva, E.N., Tuchin, V.V. (2018) Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range. *Journal of Biomedical Optics*, **23**, 035004.
  60. Leonard, D. W., Meek, K.M. (1997) Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma. *Biophys. J.*, **72**, 1382–1387.
  61. Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Tuchin, V.V. (2010) Tissue optical immersion clearing. *Expert Rev. Medm Devic.*, **7**, 825–842.
  62. Larin, K.V., Ghosn, M.G., Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Trunina, N.A., Tuchin, V.V. (2012) Optical Clearing for OCT Image Enhancement and In-Depth Monitoring of Molecular Diffusion. *Ieee J. Sel. Top. Quant.*, **18**, 1244–1259.
  63. Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Kurokawa, H., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T., Miyawaki, A. (2015) Sca/eS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat. Neurosci.*, **18**, 1518-+.
  64. Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A. (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.*, **14**, 1481–U1166.
  65. Zhu, D., Larin, K. V., Luo, Q. M., Tuchin, V. V. (2013) Recent progress in tissue optical clearing. *Laser Photonics Rev.*, **7**, 732–757.
  66. Bui, A. K., McClure, R. A., Chang, J., Stoianovici, C., Hirshburg, J., Yeh, A. T., Choi, B. (2009) Revisiting Optical Clearing With Dimethyl Sulfoxide (DMSO). *Laser Surg. Med.*, **41**, 142–148.
  67. Tuchin, V. V. (2007) A clear vision for laser diagnostics (review).- *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **13**, 1621–1628.
  68. Wen, X., Mao, Z.Z., Han, Z.Z., Tuchin, V.V., Zhu, D. (2010) In vivo skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism. *Journal of Biophotonics*, **3**, 44–52.
  69. Hirshburg, J., Choi, B., Nelson, J.S., Yeh, A.T. (2006) Collagen solubility correlates with skin optical clearing. *Journal of Biomedical Optics*, **11**, 040501.
  70. Hirshburg, J., Choi, B., Nelson, J.S., Yeh, A.T. (2007) Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars. *Laser Surg. Med.*, **39**, 140–144.
  71. Hirshburg, J.M., Ravikumar, K.M., Hwang, W., Yeh, A.T. (2010) Molecular basis for optical clearing of collagenous

- tissues. *Journal of Biomedical Optics*, **15**, 055002.
72. Yeh, A. T., Choi, B., Nelson, J. S., Tromberg, B. J. (2003) Reversible dissociation of collagen in tissues. *Journal of Investigative Dermatology*. **121**, 1332–1335.
73. Berezin, K.V., Dvoretzki, K.N., Chernavina, M.L., Likhter, A.M., Smirnov, V.V., Shagautdinova, I.T., Antonova, E.M., Stepanovich, E.Y., Dzhal-muhambetova, E.A., Tuchin, V.V. (2018) Molecular modeling of immersion optical clearing of biological tissues. *J. Mol. Model.*, **24**, 45.
74. Аскаръян Г.А. (1982). Увеличение прохождения лазерного и другого излучения через мягкие мутные физические и биологические среды. *Квантовая электроника*, **9**, 1379–1383.
75. Chan, E.K., Sorg, B., Protsenko, D., O'Neil, M., Motamedi, M., Welch, A.J. (1996) Effects of compression on soft tissue optical properties. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **2**, 943–950.
76. Ding, H.F., Lu, J.Q., Wooden, W.A., Kragel, P.J., Hu, X.H. (2006) Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm. *Physics in Medicine and Biology*, **51**, 1479–1489.
77. Hoyt, L.F. (1934) New table of the refractive index of pure glycerol at 20 degrees C. *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 329–332.
78. Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Kochubey, V.I., Tuchin, V.V. (2005) Optical clearing of human dura mater. *Optics and Spectroscopy*, **98**, 470–476.
79. Vargas, O., Chan, E.K., Barton, J.K., Rylander, H.G., Welch, A.J. (1999) Use of an agent to reduce scattering in skin. *Laser Surg. Med.*, **24**, 133–141.
80. Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Sinichkin, Y.P., Kochubey, V.I., Lakodina, N.A., Tuchin, V.V. (2003) Glucose and mannitol diffusion in human dura mater. *Biophys. J.*, **85**, 3310–3318.
81. Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Tuchin, V.V. (2009) Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues. Taylor and Francis Group LLC, CRC Press, FL, USA, 744 p.
82. Vargas, G., Barton, J.K., Welch, A.J. (2008) Use of hyperosmotic chemical agent to improve the laser treatment of cutaneous vascular lesions. *Journal of Biomedical Optics*, **13**, 021114.
83. Sun, R.W., Tuchin, V.V., Zharov, V.P., Galanzha, E.I., Richter, G.T. (2018). Current status, pitfalls and future directions in the diagnosis and therapy of lymphatic malformation. *Journal of biophotonics*, **11**, e201700124.
84. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин, Ю.П., Тучин, В.В. (2006). Оптическое просветление склеры глаза in vivo под действием глюкозы. *Квантовая электроника*, **36**, 1119–1124.
85. Bashkatov, A.N., Korolevich, A.N., Tuchin, V.V., Sinichkin Yu.P., Genina, E.A., Stolnitz, M.M., Dubina, N.S., Vecherinski, S.I., Belsley, M.S. (2006) In vivo investigation of human skin optical clearing and blood microcirculation under the action of glucose solution. *Asian Journal of Physics*, **15**, 1–14.
86. Galanzha, E.I., Tuchin, V.V., Solovieva, A.V., Stepanova, T.V., Luo, Q., Cheng, H. (2003) Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, 1739–1746.
87. Zhu, D., Zhang, J., Cui, H., Mao, Z., Li, P., Luo, Q. (2008). Short-term and long-term effects of optical clearing agents on blood vessels in chick chorio-allantoic membrane. *Journal of biomedical optics*, **13**, 021106.
88. Zhu, Z.G., Wu, G.Y., Wei, H.J., Yang, H.Q., He, Y.H., Xie, S.S., Zhao, Q.L., Guo, X. (2012) Investigation of the permeability and optical clearing ability of different analytes in human normal and cancerous breast tissues by spectral domain OCT. *Journal of biophotonics*, **5**, 536–543.
89. Genina, E. A., Bashkatov, A. N., Korobko, A. A., Zubkova, E. A., Tuchin, V. V., Yaroslavsky, I., Altshuler, G. B. (2008) Optical clearing of human skin: comparative study of permeability and dehydration of intact and photothermally perforated skin. *Journal of Biomedical Optics*, **13**, 021102.

90. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. (2010). Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования *ex vivo* и *in vivo*. *Оптика и спектроскопия*, **109**, 256–263.
91. Choi, B., Tsu, L., Chen, E., Ishak, T. S., Iskandar, S. M., Chess, S., Nelson, J. S. (2005) Determination of chemical agent optical clearing potential using *in vitro* human skin. *Laser Surg. Med.*, **36**, 72–75.
92. Khan, M.H., Choi, B., Chess, S., Kelly, K.M., McCullough, J., Nelson, J.S. (2004) Optical clearing of *in vivo* human skin: Implications for light-based diagnostic imaging and therapeutics. *Laser Surg. Med.*, **34**, 83–85.
93. Mao, Z., Zhu, D., Hu, Y., Wen, X., Han, Z. (2008). Influence of alcohols on the optical clearing effect of skin *in vitro*. *Journal of biomedical optics*, **13**, 021104.
94. Proskurin, S.G., Meglinski, I.V. (2007) Optical coherence tomography imaging depth enhancement by superficial skin optical clearing. *Laser Phys. Lett.*, **4**, 824–826.
95. Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Tuchin, V.V. (2008) Optical clearing of cranial bone. *Advances in Optical Technologies*, **2008**, 1–8.
96. Ghosn, M.G., Tuchin, V.V., Larin, K.V. (2006) Depth-resolved monitoring of glucose diffusion in tissues by using optical coherence tomography. *Opt. Lett.*, **31**, 2314–2316.
97. Wang, J., Ma, N., Shi, R., Zhang, Y., Yu, T.T., Zhu, D. (2014) Sugar-Induced Skin Optical Clearing: From Molecular Dynamics Simulation to Experimental Demonstration. *Ieee J Sel Top Quant.* **20**, 7101007.
98. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Кочубей И.В., Лакодина Н.А., Тучин, В.В. (2003). Определение коэффициента диффузии глюкозы в склере глаза человека. *Биофизика*, **48**(2), 309–313.
99. Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Tuchin, V.V. (2009) Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues. Taylor and Francis Group LLC, CRC Press. 744 p.
100. Jiang, J.Y., Wang, R.K.K. (2004) Comparing the synergistic effects of oleic acid and dimethyl sulfoxide as vehicles for optical clearing of skin tissue *in vitro*. *Physics in Medicine and Biology*, **49**, 5283–5294.
101. Xu, X.Q., Wang, R.K.K. (2004) Synergistic effect of hyperosmotic agents of dimethyl sulfoxide and glycerol on optical clearing of gastric tissue studied with near infrared spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, **49**, 457–468.
102. Ding, Y.M., Wang, J., Fan, Z.C., Wei, D., Shi, R., Luo, Q.M., Zhu, D., Wei, X.B. (2013) Signal and depth enhancement for *in vivo* flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents. *Biomed. Opt. Express.*, **4**, 2518–2526.
103. Shi, R., Guo, L., Zhang, C., Feng, W., Li, P., Ding, Z., Zhu, D. (2016) A useful way to develop effective *in vivo* skin optical clearing agents. *Journal of Biophotonics*, **10**, S1, 887–895.
104. Deng, Z., Jing, L., Wu, N., Jiang, X., Ren, Q., Li, C. (2014). Viscous optical clearing agent for *in vivo* optical imaging. *Journal of biomedical optics*, **19**, 076019.
105. Guo, L., Shi, R., Zhang, C., Zhu, D., Ding, Z., Li, P. (2016). Optical coherence tomography angiography offers comprehensive evaluation of skin optical clearing *in vivo* by quantifying optical properties and blood flow imaging simultaneously. *Journal of Biomedical Optics*, **21**, 081202.
106. Jin, X., Deng, Z., Wang, J., Ye, Q., Mei, J., Zhou, W., ... Tian, J. (2016). Study of the inhibition effect of thiazone on muscle optical clearing. *Journal of biomedical optics*, **21**, 105004.
107. Wang, J., Shi, R., Zhu, D. (2012). Switchable skin window induced by optical clearing method for dermal blood flow imaging. *Journal of biomedical optics*, **18**, 061209.
108. Zhong, H.Q., Guo, Z.Y., Wei, H.J., Guo, L., Wang, C.X., He, Y.H., Xiong, H.L., Liu, S. H. (2010) Synergistic Effect of Ultrasound and Thiazone-PEG 400 on Human Skin Optical

- Clearing In Vivo. *Photochemistry and Photobiology*, **86**, 732–737.
109. Shi, R., Chen, M., Tuchin, V.V., Zhu, D. (2015) Accessing to arteriovenous blood flow dynamics response using combined laser speckle contrast imaging and skin optical clearing. *Bio-med. Opt. Express.*, **6**, 1977–1989.
110. Plotnikov, S., Juneja, V., Isaacson, A.B., Mohler, W.A., Campagnola, P.J. (2006) Optical clearing for improved contrast in second harmonic generation Imaging of skeletal muscle. *Biophys. J.*, **90**, 328–339.
111. Wen, X., Jacques, S.L., Tuchin, V.V., Zhu, D. (2012) Enhanced optical clearing of skin in vivo and optical coherence tomography in-depth imaging. *Journal of Biomedical Optics*, **17**, 066022.
112. Vargas, G., Readinger, A., Dozier, S.S., Welch, A.J. (2003) Morphological changes in blood vessels produced by hyperosmotic agents and measured by optical coherence tomography. *Photochemistry and Photobiology*, **77**, 541–549.
113. Larina, I.V., Carbajal, E.F., Tuchin, V.V., Dickinson, M.E., Larin, K.V. (2008) Enhanced OCT imaging of embryonic tissue with optical clearing. *Laser Phys. Lett.*, **5**, 476–479.
114. Sudheendran, N., Mohamed, M., Ghosn, M.G., Tuchin, V.V., Larin, K.V. (2010) Assessment of Tissue Optical Clearing as a Function of Glucose Concentration Using Optical Coherence Tomography. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **3**, 169–176.
115. Xu, X.Q., Zhu, Q.H. (2007) Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer. *Opt. Commun.*, **279**, 223–228.
116. Zhi, Z.W., Han, Z.Z., Luo, Q.M., Zhu, D. (2009) Improve Optical Clearing of Skin in Vitro with Propylene Glycol as a Penetration Enhancer. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **2**, 269–278.
117. Caspers, P.J., Williams, A.C., Carter, E.A., Edwards, H.G., Barry, B.W., Bruining, H.A., Puppels, G.J. (2002) Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy. *Pharmaceutical Research*, **19**, 1577–1580.
118. Notman, R., den Otter, W.K., Noro, M.G., Briels, W.J., Anwar, J. (2007) The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide Bilayers simulated by molecular dynamics. *Biophys J.*, **93**, 2056–2068.
119. Vejnovic, I., Simmler, L., Betz, G. (2010) Investigation of different formulations for drug delivery through the nail plate. *Int. J. Pharmaceut.*, **386**, 185–194.
120. Kuriharabergstrom, T., Knutson, K., Denoble, L.J., Goates, C.Y. (1990) Percutaneous-Absorption Enhancement of an Ionic Molecule by Ethanol Water-Systems in Human Skin. *Pharmaceutical Research*, **7**, 762–766.
121. Timoshina, P.A., Zinchenko, E.M., Tuchina, D.K., Sagatova, M.M., Semiyachkina-Glushkovskaya, O.V., Tuchin, V.V. (2017) Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow of newborn mice at optical clearing. *Proc. Spie.*, **10336**, UNSP 1033610.
122. Liu, P., Huang, Y., Guo, Z., Wang, J., Zhuang, Z., Liu, S. (2013). Discrimination of dimethyl sulfoxide diffusion coefficient in the process of optical clearing by confocal micro-Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **18**, 020507.
123. Samatham, R., Phillips, K.G., Jacques, S.L. (2010) Assessment of Optical Clearing Agents Using Reflectance-Mode Confocal Scanning Laser Microscopy. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **3**, 183–188.
124. Millon, S.R., Roldan-Perez, K.M., Riching, K.M., Palmer, G.M., Ramanujam, N. (2006) Effect of optical clearing agents on the in vivo optical properties of squamous epithelial tissue. *Laser Surg. Med.*, **38**, 920–927.
125. Vargas, G., Chan, K.F., Thomsen, S.L., Welch, A.J. (2001) Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue: Effects on the detected fluorescence signal measured through skin. *Laser Surg. Med.*, **29**, 213–220.
126. Weigmann, H.J., Lademann, J., Schanzer, S., Lindemann, U., von Pelchrzim, R., Schaefer, H., Sterry, W.,

- Shah, V. (2001) 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**, Suppl. 1, 98–102.
127. Stumpp, O., Chen, B., Welch, A. J. (2006) Using sandpaper for noninvasive transepidermal optical skin clearing agent delivery. *Journal of Biomedical Optics*, **11**, 041118.
128. Lee, W.R., Tsai, R.Y., Fang, C.L., Liu, C.J., Hu, C.H., Fang, J.Y. (2006) Microdermabrasion as a novel tool to enhance drug delivery via the skin: An animal study. *Dermatol. Surg.*, **32**, 1013–1022.
129. Tuchin, V.V., Altshuler, G.B., Gavrilova, A.A., Pravdin, A.B., Tabatadze, D., Childs, J., Yaroslavsky, I.V. (2006) Optical clearing of skin using flash-lamp-induced enhancement of epidermal permeability. *Laser Surg. Med.*, **38**, 824–836.
130. Stumpp, O.F., Welch, A.J., Milner, T.E., Neev, J. (2005) Enhancement of transepidermal skin clearing agent delivery using a 980 nm diode laser. *Laser Surg. Med.*, **37**, 278–285.
131. Liu, C., Zhi, Z., Tuchin, V.V., Zhu, D. (2009) Combined laser and glycerol enhancing skin optical clearing. *SPIE Proceedings*, **7186**, 71860D.
132. Nugroho, A.K., Li, G.L., Danhof, M., Bouwstra, J.A. (2004) Transdermal iontophoresis of rotigotine across human stratum corneum in vitro: influence of pH and NaCl concentration. *Pharmaceutical research*, **21**, 844–850.
133. Tezel, A., Mitragotri, S. (2003) Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis. *Biophys J.*, **85**, 3502–3512.
134. Konig, K. (2008) Clinical multiphoton tomography. *Journal of Biophotonics*, **1**, 13–23.
135. Tseng, S.J., Lee, Y.H., Chen, Z.H., Lin, H.H., Lin, C.Y., Tang, S.C. (2009). Integration of optical clearing and optical sectioning microscopy for three-dimensional imaging of natural biomaterial scaffolds in thin sections. *Journal of Biomedical Optics*, **14**, 044004.
136. Chiang, Ann-Shyn. «Aqueous tissue clearing solution.» U.S. Patent No. 6,472,216. 29 Oct. 2002.
137. Cicchi, R., Sestini, S., De Giorgi, V., Massi, D., Lotti, T., Pavone, F.S. (2008) Nonlinear laser imaging of skin lesions. *Journal of Biophotonics*, **1**, 62–73.
138. Klemp, M., Meinke, M.C., Weinigel, M., Rowert-Huber, H.J., Konig, K., Ulrich, M., Lademann, J., Darvin, M.E. (2016) Comparison of morphologic criteria for actinic keratosis and squamous cell carcinoma using in vivo multiphoton tomography. *Experimental dermatology*, **25**, 218–222.
139. Hovhannisyan, V.A., Hu, P.S., Chen, S. J., Kim, C. S., Dong, C. Y. (2013). Elucidation of the mechanisms of optical clearing in collagen tissue with multiphoton imaging. *Journal of biomedical optics*, **18**, 046004.
140. Migacheva, E.V., Pravdin, A.B., Tuchin, V.V. (2010) Alterations in Autofluorescence Signal from Rat Skin Ex Vivo under Optical Immersion Clearing. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **3**, 147–152.
141. Kong, K., Kendall, C., Stone, N., Notingher, I. (2015) Raman spectroscopy for medical diagnostics – From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Adv. Drug Deliver Rev.*, **89**, 121–134.
142. Krafft, C., Schmitt, M., Schie, I.W., Cialla-May, D., Matthaus, C., Bocklitz, T., Popp, J. (2017) Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **56**, 4392–4430.
143. Jermyn, M., Desroches, J., Aubertin, K., St-Arnaud, K., Madore, W.J., De Montigny, E., Guiot, M.C., Trudel, D., Wilson, B.C., Petrecca, K., Leblond, F. (2016) A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology. *Physics in Medicine and Biology*, **61**, R370–R400.

144. Binder, L., SheikhRezaei, S., Baierl, A., Gruber, L., Wolzt, M., Valenta, C. (2017) Confocal Raman spectroscopy: In vivo measurement of physiological skin parameters – A pilot study. *Journal of Dermatological Science*, **88**, 280–288.
145. Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., Darvin, M.E. (2017) Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. *Mech. Ageing. Dev.*, **172**, S1, 6–12.
146. Darvin, M.E., Gersonde, I., Ey, S., Brandt, N.N., Albrecht, H., Gonchukov, S.A., Sterry, W., Lademann, J. (2004) Noninvasive detection of beta-carotene and lycopene in human skin using Raman spectroscopy. *Laser Phys.*, **14**, 231–233.
147. Richters, R.J., Falcone, D., Uzunbajakava, N.E., Varghese, B., Caspers, P.J., Puppels, G.J., van Erp, P.E., van de Kerkhof, P.C. (2017) Sensitive Skin: Assessment of the Skin Barrier Using Confocal Raman Microspectroscopy. *Skin Pharmacology and Physiology*, **30**, 1–12.
148. Choe, C., Lademann, J., Darvin, M. E. (2015) Analysis of Human and Porcine Skin in vivo/ex vivo for Penetration of Selected Oils by Confocal Raman Microscopy. *Skin Pharmacology and Physiology*, **28**, 318–330.
149. Binder, L., Kulovits, E. M., Petz, R., Ruthofer, J., Baurecht, D., Klang, V., Valenta, C. (2018) Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy – A comparative study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **130**, 214–223.
150. Mujica Ascencio, S., Choe, C., Meinke, M.C., Muller, R.H., Maksimov, G.V., Wigger-Alberti, W., Lademann, J., Darvin, M.E. (2016) Confocal Raman microscopy and multivariate statistical analysis for determination of different penetration abilities of caffeine and propylene glycol applied simultaneously in a mixture on porcine skin ex vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **104**, 51–58.
151. Enejder, A.M.K., Scecina, T.G., Oh, J., Hunter, M., Shih, W.C., Sasic, S., Horowitz, G.L., Feld, M.S. (2005) Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements. *Journal of Biomedical Optics*, **10**, 031114.
152. McNichols, R.J., Cote, G.L. (2000) Optical glucose sensing in biological fluids: an overview. *Journal of Biomedical Optics*, **5**, 5–16.
153. Quatela, A., Miloudi, L., Tfayli, A., Baillet-Guffroy, A. (2016) In vivo Raman Microspectroscopy: Intra- and Intersubject Variability of Stratum Corneum Spectral Markers. *Skin Pharmacology and Physiology*, **29**, 102–109.
154. Zimmerley, M., McClure, R.A., Choi, B., Potma, E.O. (2009) Following dimethyl sulfoxide skin optical clearing dynamics with quantitative nonlinear multimodal microscopy. *Appl. Optics*, **48**, D79–D87.
155. Huang, D., Zhang, W., Zhong, H., Xiong, H., Guo, X., Guo, Z. (2012) Optical clearing of porcine skin tissue in vitro studied by Raman microspectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **17**, 015004.
156. Kim, S., Byun, K.M., Lee, S.Y. (2017) Influence of water content on Raman spectroscopy characterization of skin sample. *Biomed Opt Express*, **8**, 1130–1138.
157. Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., Darvin, M.E. (2018) Human skin in vivo has a higher skin barrier function than porcine skin ex vivo-comprehensive Raman microscopic study of the stratum corneum. *Journal of Biophotonics*, **11**, e201700355.
158. Hokr, B.H., Yakovlev, V.V. (2013) Raman signal enhancement via elastic light scattering. *Opt. Express*, **21**, 11757–11762.
159. Matousek, P. (2007) Raman signal enhancement in deep spectroscopy of turbid media. *Appl. Spectrosc.*, **61**, 845–854.
160. Oelkrug, D., Boldrini, B., Rebner, K. (2017) Comparative Raman study of transparent and turbid materials: models and experiments in the remote sensing mode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **409**, 673–681.

161. Zhu, Y., Choe, C. S., Ahlberg, S., Meinke, M. C., Alexiev, U., Lademann, J., Darvin, M. E. (2015) Penetration of silver nanoparticles into porcine skin ex vivo using fluorescence lifetime imaging microscopy, Raman microscopy, and surface-enhanced Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, **20**, 051006.
162. Wang, Y., Ji, W., Yu, Z., Li, R., Wang, X., Song, W., Ruan, W.D., Zhao, B., Ozaki, Y. (2014) Contribution of hydrogen bonding to charge-transfer induced surface-enhanced Raman scattering of an intermolecular system comprising p-aminothiophenol and benzoic acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 3153–3161.
163. Yamamoto, Y. S., Ishikawa, M., Ozaki, Y., Itoh, T. (2014) Fundamental studies on enhancement and blinking mechanism of surface-enhanced Raman scattering (SERS) and basic applications of SERS biological sensing. *Front. Phys.-Beijing*, **9**, 31–46.
164. Zhang, Y.F., Li, D.Q., Zhou, X.Y., Gao, X.H., Zhao, S.Y., Li, C. (2016) Enhancing sensitivity of SERRS nanoparticles by modifying heptamethine cyanine-based reporter molecules. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **9**, S1, 1642005.
165. Ozaki, Y., Kneipp, K., Aroca, R. (2014). *Frontiers of surface-enhanced Raman scattering: single nanoparticles and single cells*. John Wiley Sons, 330 p.
166. Zhang, Y., Liu, H., Tang, J., Li, Z., Zhou, X., Zhang, R., Chen, L., Mao, Y., Li, C. (2017) Noninvasively Imaging Subcutaneous Tumor Xenograft by a Handheld Raman Detector, with the Assistance of an Optical Clearing Agent. *ACS Appl. Mater Interfaces*, **9**, 17769–17776.
167. Darvin, M.E., Schleusener, J., Parenz, F., Seidel, O., Krafft, C., Popp, J., Lademann, J. (2018). Confocal Raman microscopy combined with optical clearing for identification of inks in multicolored tattooed skin in vivo. *Analyst*, DOI: 10.1039/C8AN01213J.
168. Choe, C., Lademann, J., Darvin, M. E. (2016). Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo. *Analyst*, **141**, 6329–6337.
169. Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., Darvin, M.E. (2017) Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy. *Sci. Rep.*, **7**, 15900.
170. Sdobnov, A.Y., Darvin, M.E., Schleusener, J., Lademann, J., Tuchin, V.V. (2018) Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—quantitative analysis using confocal Raman microscopy. *Journal of Biophotonics*, Submitted article.
171. Nakagawa, N., Matsumoto, M., Sakai, S. (2010) In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy. *Skin Res. Technol.*, **16**, 137–141.