

# Конфокальная рамановская визуализация срезов кожи, содержащих волосяные фолликулы, с использованием классической регрессии с применением метода наименьших квадратов и многомерного разрешения кривых с использованием ограниченного алгоритма чередующихся наименьших квадратов\*

И.Шлойзнер\*\*, В.Каррер\*\*, А.Патцельт, Ш.Го, Т.Боклиц, Л.Кодерх, Ю.Ладеманн, М.Е.Дарвин

*Конфокальная рамановская микроскопия (КРМ) применена для визуализации пространственного распределения различных компонентов кожи в кожных срезах ex vivo, содержащих волосяные фолликулы. Для соответствующего анализа многомерных данных применялись различные методы разложения по эталонным спектрам компонентов кожи (дерма, жизнеспособный эпидермис, роговой слой и волосы). Как наиболее подходящие, нами были выбраны классическая регрессия с применением метода наименьших квадратов и многомерное разрешение кривых с использованием ограниченного алгоритма чередующихся наименьших квадратов. Полезным применением КРМ в сочетании с анализом многомерных данных может быть анализ путей проникновения в кожу таких местно применяемых веществ, как косметические или лекарственные препараты, особенно внутри волосяных фолликулов или вокруг них.*

**Ключевые слова:** дерматология, оптическая профилометрия, анализ многомерных данных, гиперспектральная визуализация, визуализация кожи, конфокальная рамановская микроскопия.

## 1. Введение

На протяжении многих лет для микроскопического анализа кожных срезов и волосяных фолликулов применялись разнообразные оптические методы. Волосяные фолликулы представляют заметный интерес, т. к. они содержат множество компонентов кожи и волоса, находящихся в непосредственной близости друг от друга, и являются важным путем проникновения препаратов местного применения [1, 2]. Анатомически фолликул представляет

собой инвагинацию эпидермиса, которая приводит к увеличению площади поверхности, участвующей в поглощении лекарств. Более того, указанные инвагинации окружены многочисленными капиллярами кровеносной системы, способствующими системному поглощению. Наличие многочисленных антиген-представляющих клеток вокруг верхней части волосяных фолликулов особенно интересны с точки зрения иммунотерапии. Более того, недавние исследования показали, что волосяной фолликул может служить резервуаром для длительного (до 10 суток) хранения местно применяемых наноносителей [3].

Обычная оптическая микроскопия – быстрый и простой метод, подходящий для морфологической визуализации и широко применяемый в гистологии. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) может использоваться в отражательном и флуоресцентном режимах [4, 5]. Последний также позволяет визуализировать распределение флуоресцентного красителя в биологическом образце. Это полезно, например, для анализа глубины проникновения препаратов местного применения в кожу. Таким образом достигаются визуализация и даже количественное определение нанесенных на кожу веществ [6, 7]. Однако проникновение используемого вещества может отличаться от проникновения добавленных флуоресцентных красителей.

Существуют также несколько методов визуализации внутреннего молекулярного состава таких биологических образцов, как кожа, без использования флуоресцентных меток [8]. Для исследования проникновения веществ можно применять двухфотонную микроскопию в сочетании с техникой визуализации времени жизни флуоресценции, однако существующие при этом сильные ограничения связаны с частым наложением характеристик кожи и рассматриваемого вещества [9, 10]. Очевидным достоинством КЛСМ и двухфотонной микроскопии яв-

\* Перевод с англ. В.Л.Дербова.

\*\*Эти авторы внесли равные вклады в работу.

**J.Schleusener, A.Patzelt, J.Lademann, M.E.Darvin.** Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; e-mail: juergen.lademann@charite.de

**V.Carrer.** Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; Institute of Advanced Chemistry of Catalonia, Department of Chemical and Surfactants Technology, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain  
**S.Guo, T.Bocklitz.** Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-University of Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany; Leibniz Institute of Photonic Technology, Member of Leibniz Research Alliance 'Health Technologies', Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Germany

**L.Coderch.** Institute of Advanced Chemistry of Catalonia, Department of Chemical and Surfactants Technology, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Поступила в редакцию 25 сентября 2018 г., после доработки – 12 октября 2018 г.

ляется малое время накопления данных, что открывает возможность измерений на коже *in vivo*.

Применение микроскопии вынужденного рамановского рассеяния позволяет получать изображения различных химических компонентов без использования меток с высоким пространственным разрешением и может использоваться для визуализации проникновения местно применяемых веществ [11, 12].

ИК микроспектроскопия и конфокальная рамановская микроскопия (КРМ) содержат молекулярную информацию и пригодны для оценки проникновения местно применяемых агентов в кожу [13–17]. В обоих оптических методах сочетаются спектральная и пространственная информация, которую можно использовать для гиперспектральной визуализации. Хотя время накопления данных в рамановском методе заметно больше, чем при КЛСМ с использованием изотопически меченых функциональных групп, метод позволяет не только обнаруживать молекулярный состав, но и проводить мониторинг состояния водородных связей молекул воды [18], структурных изменений (например, вторичных и третичных структур белка [18, 19], и упорядочения липидной цепи [20, 21]) *ex vivo* и *in vivo*, что недавно было показано на примере точечного профилирования рогового слоя, а также дает информацию о барьерной функции кожи [22–24]. Однако из-за медленного накопления данных в процессе сканирования эти методы не вполне подходят для 3D имиджинговых измерений кожи *in vivo*. В будущем возможно ускорение данного метода при использовании мультиплексных подходов [25, 26].

При КРМ относительное содержание различных биомолекул в объеме измерения можно определить по интенсивности рамановских полос, что делает возможной дифференциацию клеток и тканей, кожи и местно применяемых веществ. Выполнена также идентификация пигментов татуировки в случае татуированной кожи [27]. Кроме спектроскопического анализа локального химического состава, КРМ позволяет получить изображение при сканировании образца, дающем распределение компонентов с пространственным разрешением. Для получения изображений с помощью спектров комбинационного рассеяния использовалось несколько методов. Для молекулярного имиджинга вкладов различных компонентов кожи или местно применяемых веществ, например кофеина [28], в разных точках можно использовать картирование проинтегрированной площади под кривой или нелинейную регрессию гауссовой функции отдельных рамановских полос. Однако различные полосы в спектрах комбинационного рассеяния, как правило, не могут быть ассоциированы с различными компонентами кожи, т. к. одни и те же вещества присутствуют в разных компонентах в различных концентрациях. Полезность данного метода для визуализации фолликулярного проникновения может ограничиваться также возможным наложением полос от кожи и проникающего вещества. Достоинством таких методов является их простота, но в случае сильного наложения компонентов можно ожидать проявления артефактов, приводящих к неправильной идентификации. Чтобы обойти указанные трудности и получить возможность детектирования весьма малых спектральных различий, существуют несколько методов многомерного анализа, при использовании которых рассматривается информация обо всем рамановском спектре, а не об отдельных его полосах [29].

В работе [30] Zhang и др. использовали многомерный факторный анализ, чтобы определить области сходства, которые затем на основании их положения относились к компонентам кожи, таким как роговой слой, жизнеспособный эпителий и дерма. Tsai и др. [31] применяли анализ главных компонент в сочетании с линейным дискриминантным анализом для визуализации стволовых клеток во вздутии волоса в фолликуле, где их концентрация сравнительно высока. Данный метод предназначен для обнаружения различий между двумя классами спектров. На основе априорного знания принадлежности к классам можно рассчитать чувствительность и специфичность метода. Franzen и др. [32] использовали метод многомерного анализа для молекулярного имиджинга волосных фолликулов и дифференцировали вклады волоса, эпидермиса, дермы и кожного сала [2]. Были выявлены сходные признаки кожного сала в волосных фолликулах человека и свиньи и получено изображение его распределения по волосу. Эта информация является важной, потому что фолликулярное кожное сало представляет собой среду для лекарств, проникающих в кожу по фолликулярному пути. Поступление лекарства в волосные фолликулы может зависеть от его физико-химических свойств, от сходства липидных составов кожного сала и лекарственного препарата, а также от степени активности, размера и плотности волосяного фолликула [33, 34].

Еще одним методом идентификации различных компонентов является классическая регрессия с применением метода наименьших квадратов (МНК). Для этого требуется эталонный спектр каждого чистого вещества в образце (матрица нагрузок), используемый для вычисления их вкладов в наборы данных (матрица весовых множителей). Этот алгоритм аппроксимирует спектр в каждой пространственной точке линейной комбинацией эталонных спектров. Весовые множители, соответствующие вкладу каждого эталонного спектра, оптимизируются для достижения наилучшего соответствия оригинальному спектру. Полученные множители затем используются для создания карты, отражающей распределение чистых веществ. Метод МНК считается наиболее надежным в том случае, когда все эталонные спектры чистых веществ в образце известны, как, например, при визуализации распределения химических веществ в фармацевтических препаратах (таблетки) на основе данных комбинационного рассеяния [35, 36] или глубины проникновения местно наносимых веществ [37]. Однако доступность эталонных спектров чистых веществ может быть проблематичной при измерениях с биологическими клетками или тканями сложного состава, когда известен только ограниченный набор необходимых эталонных спектров. Для кожи Caspers и др. [38] улучшили количественный анализ путем использования спектров чистых веществ, образующих роговой слой. Эффективность МНК еще более снижается в присутствии сдвигов или изменений ширины рамановских линий, что может произойти при взаимодействии чистых веществ друг с другом. Одна из возможностей улучшения метода МНК состоит в выборе при анализе определенных диапазонов длин волн [39].

Альтернативным методом является метод многомерного разрешения кривых с использованием ограниченного алгоритма чередующихся наименьших квадратов (MCR-ALS) [40], который широко применялся в различных приложениях гиперспектрального имиджинга на основе комбинационного (рамановского) рассеяния

[41, 42] и в исследованиях проникновения веществ в кожу [43]. Как и МНК, алгоритм MCR-ALS способен восстанавливать концентрацию и спектры чистых веществ, определяемых при анализе, а также дополнительно оценивать спектральные проявления их возможных взаимодействий. Метод оказался особенно полезным в случаях, когда спектры чистых веществ недоступны [44–47]. С помощью MCR-ALS, например, была выполнена визуализация нескольких форм кожного рака [48] с разрешением компонентов. Математически все спектры коллективной смеси раскладываются на две матрицы: матрицу нагрузок и матрицу весовых множителей. Нагрузками называется химически интерпретируемый базис, отражающий спектры компонентов, а весовые множители представляют собой профили концентрации соответствующего компонента. Данное разложение проводится с использованием итерационного метода чередующихся наименьших квадратов [49–51]. Число вносящих вклад чистых компонентов можно оценить с помощью разложения по сингулярным числам матрицы. В отличие от МНК, при MCR-ALS знания чистых спектров компонентов не требуется. Вместо этого их можно первоначально оценить с помощью алгоритма SIMPLISMA [52]. Тем не менее доступные эталонные спектры могут служить в качестве отправной точки для итерационной процедуры оптимизации. Основным преимуществом методов МНК и MCR-ALS является возможность анализировать спектры в целом, а не интенсивности отдельных полос.

В настоящей работе мы исследовали пространственное распределение компонентов кожи в срезах, содержащих волосяные фолликулы, с использованием рамановской микроскопической визуализации в сочетании с методами МНК и MCR-ALS. Мы сравнили эти методы по их способности извлекать полуколичественную информацию о компонентах кожи с пространственным разрешением. Показано, что компоненты кожи можно различать по их молекулярной структуре, выявляемой рамановскими спектрами. Это обеспечивает дополнительную информацию, которую нельзя извлечь обычными методами визуализации, такими как лазерная сканирующая микроскопия. Кроме того, возможно дальнейшее улучшение результатов за счет включения предварительной дифференциации различных компонентов кожи. Работа демонстрирует потенциал рамановской микроскопической визуализации в сочетании с методами МНК и MCR-ALS при определении характеристик проникновения веществ местного применения, что является сложной задачей по причине низких концентраций этих веществ и многообразия собственных компонентов кожи.

## 2. Методы исследования

### 2.1. Приготовление кожных образцов

В настоящей работе для исследований была выбрана кожа свиньи из-за ее морфологического сходства с кожей человека [5] и удобства измерений *ex vivo* [5, 53]. Сходство рамановских спектроскопических свойств кожи человека и свиньи неоднократно отмечалось в литературе [9, 54]. Ухо свиньи, полученное от местного мясника и использованное в экспериментах в день забоя, было очищено холодной проточной водой и высушено бумажными полотенцами. Щетинки были аккуратно укорочены ножницами, так, чтобы не нарушить целостность рогового слоя.

Образцы кожи для биопсии отделялись от нижележащих тканей с помощью скальпеля. Для облегчения их отделения наносился криоспрей (Cryo-Spray, SLEE medical GmbH, Германия). Образцы зажимались между двумя стеклянными пластинками, снова фиксировались криоспреем, помещались в жидкий азот и затем хранились в морозильной камере при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до дальнейшей обработки. Эксперименты были одобрены Инспекцией по ветеринарии и пищевым продуктам (Даме Шпреевальд, Германия).

### 2.2. Криогистологические поперечные срезы

Приготовление образцов поперечных срезов проводилось с помощью криомикротомы (Cryostat Microm HM 560, Microm International GmbH, Германия). Каждый образец после биопсии помещался в замораживающую среду (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Германия) на металлическом держателе внутри криомикротомы при  $-30^{\circ}\text{C}$ . Лезвиями микротомы кожа разрезалась на слои толщиной 30 мкм, которые затем помещались на предметные стекла Superfrost (Carl Roth GmbH + Co KG, Германия) и хранились для дальнейшего анализа при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для последующих измерений выбирались срезы, содержащие волосяные фолликулы.

### 2.3. Конфокальная рамановская микроскопия

*2.3.1. Накопление данных.* Измерения срезов кожи, содержащих волосяные фолликулы, выполнялись при помощи системы Labram HR800 Evolution CRM (Horiba Jobin Yvon, Франция) в области отпечатков пальцев ( $400\text{--}2500\text{ см}^{-1}$ ) с возбуждением излучением на длине волны 473 нм с оптической мощностью 6.1 мВт на поверхности образца, дифракционной решеткой 600 штрих./мм и спектральным разрешением менее  $4\text{ см}^{-1}$ . Преимуществом синего света для данного применения является меньший по сравнению с ИК возбуждением размер пятна. Поскольку измерения проводились исключительно на поверхности образца, снижением проникновения света внутрь кожи из-за поглощения и рассеяния [55, 56] можно пренебречь. Микроскопические изображения волосяных фолликулов получались с  $10^{\times}$ -объективом, а для рамановских измерений использовался  $100^{\times}$ -объектив. Участки изображаемой поверхности выбирались сообразно протяженности каждого волосяного фолликула. Карты волосяного фолликула включали  $80 \times 90$  спектров на площади в  $1\text{ мм}^2$ . При экспозиции 5 с на один спектр полное время накопления данных для одного среза составляло несколько часов, так что процесс занимал всю ночь.

Для нахождения поверхности образца в каждой точке применялся режим автофокусировки отражения, включенный в пакет математического обеспечения Labspec (Horiba Jobin Yvon, Франция), с использованием интенсивности отраженного света, а не рамановского сигнала [57]. Это сокращало полное время накопления данных, поскольку для каждой координаты  $x, y$  записывался только один спектр. Автофокусировка устанавливалась индивидуально для каждого волосяного фолликула согласно следующей процедуре. Путем визуальной фокусировки на образец значение  $z = 0$  приписывалось нижней точке образца (стекло). Затем получали значение  $z$  в высшей точке образца (в норме – волос). Таким образом устанавливался диапазон автофокусировки, который сканиро-

вался с шагом 1 мкм для определения поверхности при формировании изображения.

**2.3.2. Эталонные спектры компонентов.** Эталонные спектры чистых веществ использовались в методах МНК и MCR-ALS для определения распределения соединения по волосяному фолликулу. Эталонные спектры рогового слоя, жизнеспособного эпидермиса, дермы, волоса, стеклянной подложки и капель криоспрея были получены в тех точках криосреза, в которых однозначно определялся характер компонента.

За исключением пятикратного увеличения времени интегрирования, все эталонные измерения выполнялись с теми же параметрами, которые использовались при накоплении данных для построения изображения.

## 2.4. Анализ данных методами МНК и MCR-ALS

**2.4.1. Метод МНК.** Расчеты методом МНК производились с помощью программного пакета Labspec. Космические всплески исключались, а флуоресцентный фон аппроксимировался полиномом седьмого порядка и вычитался из рамановских спектров. Затем выполнялась многомерная МНК-регрессия с применением эталонных спектров компонентов. Вклады нормировались так, чтобы сумма весовых множителей равнялась 100%, а их значения были неотрицательными. Наконец, вклады различных компонентов отображались на микроскопическом изображении интенсивностью определенного цвета. Поскольку каждый рамановский спектр является характерическим признаком химического состава образца, можно проанализировать пространственное распределение различных веществ. Обозначая условным цветом каждый компонент, можно получить распределение всех эталонных спектров в пределах исследуемого среза, что дает изображение сканируемой области с цветовым кодированием состава. Смесь веществ отображается смесью цветов.

**2.4.2. Метод MCR-ALS.** Записанные спектры анализировались также с помощью метода MCR-ALS. Для этого использовались собственные алгоритмы на основе языка программирования Gnu R [58]. Все спектры предварительно обрабатывались, включая удаление всплесков, коррекцию нуля и нормировку векторов [59, 60]. В частности, коррекция нулевого уровня достигалась с применением асимметричного МНК, реализованного в пакете «baseline» [61]. Вычисления с применением метода MCR-ALS выполнялись с помощью пакета «ALS» [62]. Эталонные спектры компонентов брались в качестве начальных оценок для MCR-ALS. Единственным ограничением при проведении оптимизации было условие неотрицательности весовых множителей и нагрузок [63]. Весовой множитель каждого компонента делился на их сумму для каждой точки измерений с целью получения полуколичественных параметров соответствующего компонента подобно тому, как это было сделано в работе Vajna и др. [36].

## 3. Результаты и их обсуждение

### 3.1. Эталонные спектры компонентов

На рис.1 показаны предварительно обработанные спектры компонентов волосяного фолликула и внешних компонентов. Видны заметные различия между спектрами тканей (роговой слой, волос, жизнеспособный эпидер-

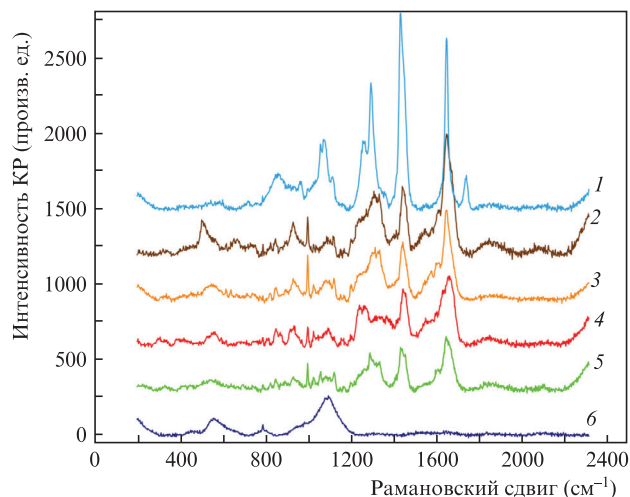


Рис.1. Эталонные рамановские спектры криоспрея (1), волоса (2), жизнеспособного эпидермиса (3), дермы (4), рогового слоя (5), а также стеклянной подложки (6) в области отпечатков пальцев. Для ясности спектры показаны с отступом. Цветные изображения рис.1–4 помещены на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

мис и дерма). Главным отличием спектра волоса от спектров остальных тканей является содержание серы [64], которое обнаруживается по сравнительно высоким интенсивностям полосы S–S в области  $510\text{--}530\text{ см}^{-1}$  [65]. Повышенное количество серы вызвано повышенным количеством серосодержащих аминокислот (цистеин) в твердых кератинах волоса. В составе волоса 7%–8% аминокислот представляют собой цистеин, тогда как в роговом слое (ткань с большим содержанием кератина) он составляет только 0.5% [66]. Высокое содержание кератина в волосе отражается также в наличии более сильной полосы амид-I на частоте  $1650\text{ см}^{-1}$  по сравнению с другими спектрами.

По сравнению с волосом, роговой слой имеет некоторые особенности: не только более низкую интенсивность уже отмеченных выше полос, связанных с содержанием серы ( $505$  и  $1650\text{ см}^{-1}$ ), но и присутствие выделяющейся полосы на частоте  $1064\text{ см}^{-1}$ , связанной со скелетным валентным колебанием C–C липидов [67].

Спектр дермы можно отличить от спектра эпидермиса по двум двойным полосам в областях  $815\text{--}850\text{ см}^{-1}$  и  $920\text{--}940\text{ см}^{-1}$ . Эти полосы соответствуют коллагену [68], который локализован в папиллярной и ретикулярной дерме [69–71], и чувствителен к его гидратации [72].

### 3.2. Результаты визуализации

**3.2.2. Метод МНК.** После обработки спектральных данных методом МНК для идентификации распределения компонентов, получалось рамановское изображение в условных цветах, представляющих вклад каждого эталонного рамановского спектра в области отпечатков пальцев. На рис.2,а представлено микроскопическое обзорное изображение кожного среза, содержащего волосяной фолликул с интактным волосом, сшитое из двух фотографических изображений. На рис.2,б дерма показана красным, жизнеспособный эпидермис – желтым, волос – коричневым, роговой слой – зеленым, покровное стекло – темно-синим, а капли криоспрея – светло-синим цветом. Такой подход отражает различия в интенсивностях и позволяет отметить одновременное присутствие разных

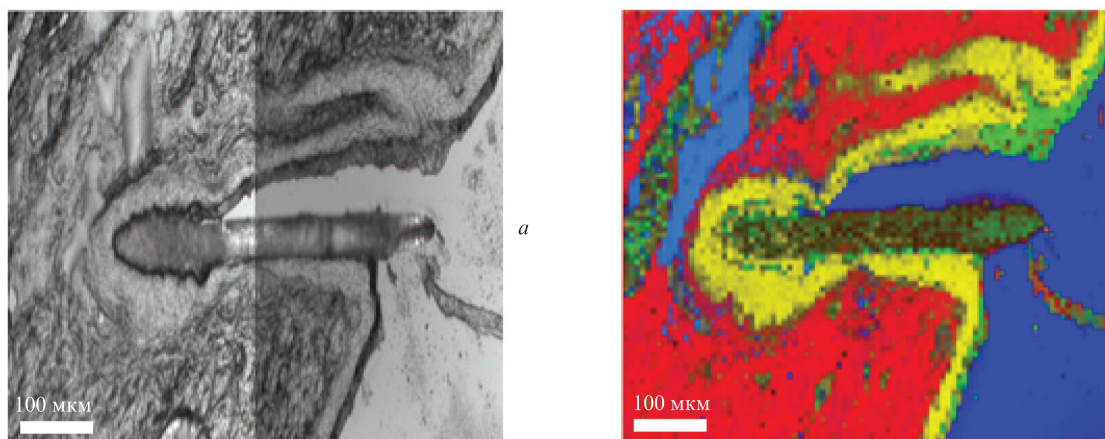


Рис.2. Микроскопическое обзорное изображение кожного среза, содержащего волосяной фолликул с интактным волосом, сшитое из двух фотографических изображений (а), и результат обработки методом МНК рамановских спектров того же волосяного фолликула (б).

компонентов в одном месте. Таким образом обеспечивается детальное изображение распределения различных компонентов.

На рис.2,б волос правильно определяется на криосрезе. Жизнеспособный эпидермис и дерма ясно дифференцируются как два разных слоя. При непосредственном сравнении расположенные рядом изображения расчетных распределений трех компонентов (волос, жизнеспособный эпидермис и дерма) соответствуют их распределениям на микрофотографии. Корректность отображения рогового слоя более проблематична, полученные весовые множители оказываются не только распределен-

ными на поверхности кожи, но и рассеянными по волосу и по наиболее глубокой области волосяного фолликула. Роговой слой правильно идентифицируется в воронке и на наружной поверхности кожи, где его толщина составляет 10–20 мкм [73]. Ниже воронки изображение рогового слоя имеет много разрывов и меньшую интенсивность. Одно из возможных объяснений этого состоит в том, что если в верхней части воронки эпителий покрыт интактным роговым слоем, барьер в нижней ее части прерывается по мере переключения дифференциального паттерна с эпидермальной дифференциации на трихолеммальную [74]. В связи с этим накопленные в данных областях спек-

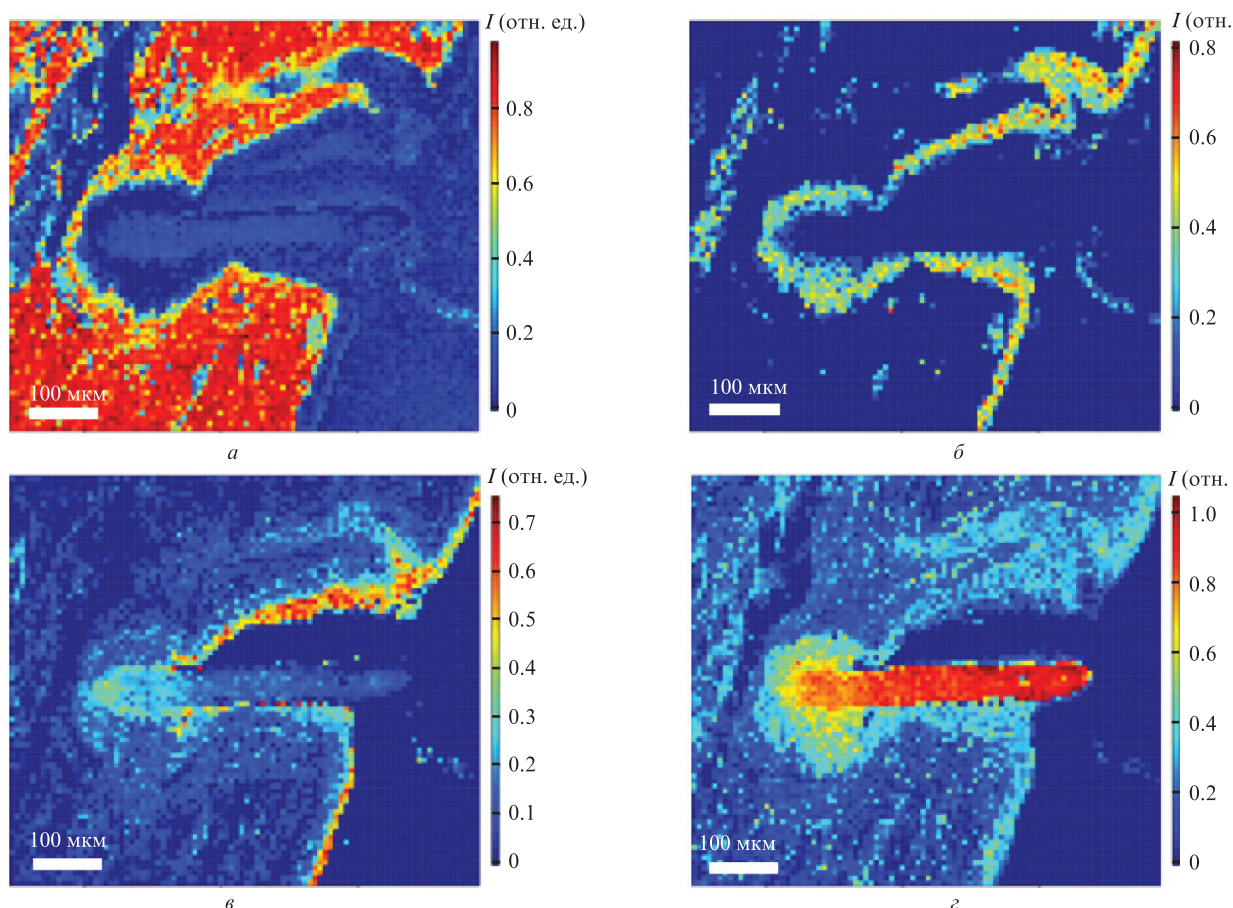


Рис.3. Тепловые карты распределения компонентов при расчете методом MCR-ALS для дермы (а), жизнеспособного эпидермиса (б), рогового слоя (в) и волоса (г) относительно положения волосяного фолликула.

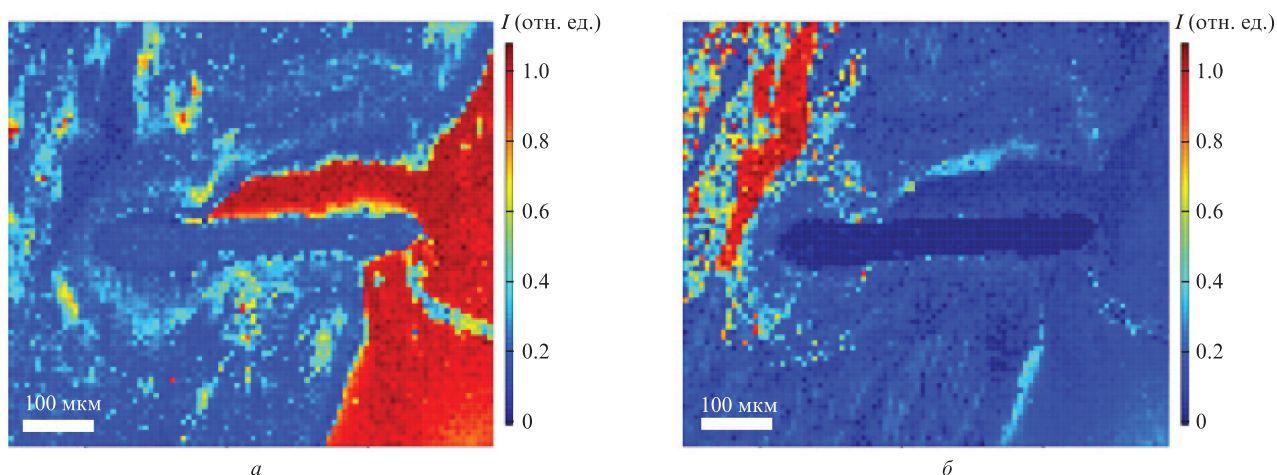


Рис.4. Тепловые карты по результатам расчета методом MCR-ALS для стеклянной подложки (а) и криоспрея (б) относительно положения волосяного фолликула.

тры постепенно приобретают «эпидермообразные» признаки. Ложные признаки рогового слоя видны и вблизи капель криоспрея на большой глубине. Нужно отметить, что в этой области локализация других компонентов также определяется недостаточно хорошо. Расчетные распределения волоса, рогового слоя и стекла отображаются в этой области, хотя ни один из этих компонентов не наблюдается там на микроскопической фотографии. Мы предполагаем, что помехи для измерений могут создаваться каплями криоспрея, что нарушает правильную идентификацию компонентов в указанной области. Пролонгированная область справа от волоса, расположенная на стеклянной подложке, связана с процессом криотомии и содержит вклады различных компонентов.

**3.2.3. Метод MCR-ALS.** Те же фолликулы анализировались с применением метода MCR-ALS. Полученные результаты отображены в виде тепловых карт относительно соответствующих микроскопических изображений (см. рис.2,а). Рамановские спектры дермы, жизнеспособного эпидермиса, рогового слоя, волоса, стеклянной подложки и капель криоспрея использовались как начальные оценки для вычислений.

На рис.3 представлены тепловые карты собственных компонентов: дермы, жизнеспособного эпидермиса, рогового слоя и волоса. Внешние компоненты (стекло и криоспрей) показаны на рис.4. Области дермы, рогового слоя и волоса определяются правильно. Значительный вклад волоса виден также в окружающих областях нижней части волосяного фолликула. В силу спектрального сходства волоса и эпидермиса, эпидермальные области также демонстрируют некоторый вклад волосяного компонента, сниженный примерно вдвое. Роговой слой по большей части определяется корректно, но есть некоторые артефакты в области ниже волосяного фолликула, чаще всего вносимые криоспреем, как видно из рис.4,б. Капли криоспрея и стеклянная подложка идентифицируются наиболее четко. Это можно объяснить их сильно выраженными спектральными отличиями от остальных компонентов.

## 4. Заключение

Кожные срезы, содержащие волосяные фолликулы, проанализированы методом конфокальной рамановской микроскопии с применением техники анализа многомер-

ных данных для определения пространственного распределения компонентов кожи (рогового слоя, жизнеспособного эпидермиса, дермы, волоса).

Метод МНК отображает распределение выбранных компонентов достаточно хорошо. Некоторые помехи наблюдаются в местах обнаружения капель криоспрея, однако основные структуры волосяного фолликула изображены правильно. Следовательно, пространственное распределение кожных структур можно получить этим методом. Результаты, полученные методом MCR-ALS, показали такое же распределение компонентов фолликул, как и при использовании МНК.

Таким образом, конфокальная рамановская микроскопия в сочетании с анализом данных методом МНК или MCR-ALS позволяет визуализировать и охарактеризовать наиболее важные компоненты фолликула без применения меток или окрашивания. Более того, данные методы имеют большой потенциал для отслеживания проникновения лекарств и систем их доставки по фолликулярному или трансфолликулярному пути. Для точного определения распределения местно применяемых веществ перспективными представляются более совершенные методы дискриминантного анализа. Однако они нуждаются в обучающих наборах данных с известными распределениями веществ, что позволило бы сделать важный шаг к дальнейшему обоснованию использованных методов. Одним из подходов к решению данной задачи могла бы стать длительная иммерсия кожных срезов в веществе, обеспечивающая равномерность распределения.

Наш соавтор Виктор Каррер внес значительный вклад в настоящую работу. Он погиб до ее окончания в июле 2018 года в результате трагического дорожно-транспортного происшествия. Мы всегда будем хранить память о нем.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

1. Radtke M., Patzelt A., Knorr F., Lademann J., Netz R.R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **116**, 1251 (2017).
2. Abd E., Benson H.A.E., Roberts M.S., Grice J.E. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **31**, 252 (2018).
3. Lademann J., Richter H., Schaefer U.F., Blume-Peytavi U., Teichmann A., Otberg N., Sterry W. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19**, 232 (2006).
4. Ossadnik K., Philipp S., Bost W., Fournelle M., Richter H., Lademann J. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **31**, 308 (2018).

5. Дарвин М.Е., Рихтер Х., Жу И.Дж., Майнке М.К., Кнорр Ф., Гончуков С.А., Кёниг К., Ладеманн Ю. *Квантовая электроника*, **44**, 646 (2014) [*Quantum Electron.*, **44**, 646 (2014)].
6. Grams Y.Y., Whitehead L., Cornwell P., Bouwstra J.A. *Pharmaceutical Res.*, **21**, 851 (2004).
7. Grams Y.Y., Whitehead L., Cornwell P., Bouwstra J.A. *J. Controlled Release*, **98** 367 (2004).
8. Vogler N., Meyer T., Akimov D., Latka I., Krafft C., Bendsoe N., Svanberg K., Dietzek B., Popp J. *J. Biophotonics*, **3** 728 (2010).
9. Zhu Y., Choe C.S., Ahlberg S., Meinke M.C., Alexiev U., Lademann J., Darvin M.E. *J. Biomed. Opt.*, **20**, 051006 (2015).
10. Darvin M.E., Konig K., Kellner-Hoefer M., Breunig H.G., Werncke W., Meinke M.C., Patzelt A., Sterry W., Lademann J. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **25**, 219 (2012).
11. Saar B.G., Contreras-Rojas L.R., Xie X.S., Guy R.H. *Mol. Pharmaceutics*, **8**, 969 (2011).
12. Giubudagian M., Rancan F., Klossek A., Yamamoto K., Jurisch J., Neto V.C., Schrader P., Bachmann S., Ruhl E., Blume-Peytavi U., Vogt A., Calderon M. *J. Controlled Release*, **243**, 323 (2016).
13. Lasch P., Pacifico A., Diem M. *Biopolymers*, **67**, 335 (2002).
14. Cotte M., Dumas P., Besnard M., Tchoreloff P., Walter P. *J. Controlled Release*, **97**, 269 (2004).
15. Mendelsohn R., Flach C.R., Moore D.J. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 923 (2006).
16. Mujica Ascencio S., Choe C., Meinke M.C., Muller R.H., Maksimov G.V., Wigger-Alberti W., Lademann J., Darvin M.E. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **104**, 51 (2016).
17. Souza C., Maia Campos P., Schanzer S., Albrecht S., Lohan S.B., Lademann J., Darvin M.E., Meinke M.C. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **30**, 81 (2017).
18. Choe C., Lademann J., Darvin M.E. *Analyst*, **141**, 6329 (2016).
19. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darvin M.E. *Sci. Rep.*, **7**, 15900 (2017).
20. Choe C., Lademann J., Darvin M.E. *Analyst*, **141**, 1981 (2016).
21. Vyumvuhore R., Tfyli A., Duplan H., Delalleau A., Manfait M., Baillet-Guffroy A. **138**, 4103 (2013).
22. Richters R.J.H., Falcone D., Uzunbajakava N.E., Varghese B., Caspers P.J., Puppels G.J., van Erp P.E.J., van de Kerkhof P.C.M. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **30**, 1 (2017).
23. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darvin M.E. *J. Biophotonics*, **11**, e201700355 (2018).
24. Choe C., Schleusener J., Lademann J., Darvin M.E. *Mech. Ageing Dev.*, **172**, 6 (2017).
25. Schmäzlin E., Moralejo B., Bodenmüller D., Darvin M.E., Thiede G., Roth M.M. *J. Sens. Sens. Syst.*, **5**, 261 (2016).
26. Schmäzlin E., Moralejo B., Gersonde I., Schleusener J., Darvin M.E., Thiede G., Roth M.M. *J. Biomed. Opt.*, **23**, 105001 (2018).
27. Darvin M.E., Schleusener J., Parenz F., Seidel O., Krafft C., Popp J., Lademann J. *Analyst*, **143**, 4990 (2018).
28. Franzen L., Selzer D., Fluhr J.W., Schaefer U.F., Windbergs M. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **84**, 437 (2013).
29. Miloudi L., Bonnier F., Barreau K., Bertrand D., Perse X., Yvergnaux F., Byrne H.J., Chourpa I., Munnier E. *Analyst*, **143**, 2377 (2018).
30. Zhang G., Moore D.J., Flach C.R., Mendelsohn R. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1591 (2007).
31. Tsai T.-H., Short M.A., McLean D.I., Zeng H., McElwee K., Lui H. *Analyst*, **139**, 2799 (2014).
32. Franzen L., Mathes C., Hansen S., Windbergs M. *J. Biomed. Opt.*, **18**, 061210 (2013).
33. Valiveti S., Wesley J., Lu G.W. *Int. J. Pharm.*, **346**, 10 (2008).
34. Pfannes E.K.B., Weiss L., Hadam S., Gonnet J., Combardiere B., Blume-Peytavi U., Vogt A. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **31**, 115 (2018).
35. Zhang L., Henson M.J., Sekulic S.S. *Anal. Chim. Acta*, **545**, 262 (2005).
36. Vajna B., Farkas I., Szabo A., Zsigmond Z., Marosi G. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 30 (2010).
37. Miloudi L., Bonnier F., Tfyli A., Yvergnaux F., Byrne H.J., Chourpa I., Munnier E.J. *Biophotonics*, **11**, e201700221 (2018).
38. Caspers P.J., Lucassen G.W., Carter E.A., Bruining H.A., Puppels G.J. *J. Investigat. Dermatol.*, **116**, 434 (2001).
39. Ragno G., Vetusch C., Risoli A., Ioele G. *Talanta*, **59**, 375 (2003).
40. Jaumot J., de Juan A., Tauler R. *Chemometr. Intellig. Lab Syst.*, **140**, 1 (2015).
41. Felten J., Hall H., Jaumot J., Tauler R., de Juan A., Gorzszas A. *Nature Protocols*, **10**, 217 (2015).
42. Colares C.J.G., Pastore T.C.M., Coradin V.T.R., Camargos J.A.A., Moreira A.C.O., Rubim J.C., Braga J.W.B. *J. Brazil. Chem. Soc.*, **26**, 1297 (2015).
43. Bonnist E.Y.M., Gorce J.P., Mackay C., Pendlington R.U., Pudney P.D.A. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **24**, 274 (2011).
44. Veselinović A.M., Nikolić R.S., Nikolić G.M. *Central Eur. J. Chem.*, **10**, 1942 (2012).
45. Tres F., Treacher K., Booth J., Hughes L.P., Wren S.A., Aylott J.W., Burley J.C. *J. Control. Rel.*, **188**, 53 (2014).
46. Ando M., Hamaguchi H.O. *J. Biomed. Opt.*, **19**, 011016 (2014).
47. Noothalapati H., Sasaki T., Kaino T., Kawamukai M., Hamaguchi H.-O., Yamamoto T. *Sci. Rep.*, **6**, 27789 (2016).
48. Feng X., Moy A.J., Nguyen H.T.M., Zhang J., Fox M.C., Sebastian K.R., Reichenberg J.S., Markey M.K., Tunnell J.W. *Biomed. Opt. Express*, **8**, 2835 (2017).
49. Tauler R. *Chemometr. Intellig. Lab. Syst.*, **30**, 133 (1995).
50. Lust A., Strachan C.J., Veski P., Aaltonen J., Heinämäki J., Yliruusi J., Kogermann K. *Intern. J. Pharm.*, **486**, 306 (2015).
51. Garrido M., Rius F.X., Larrechi M.S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 2059 (2008).
52. Windig W., Guilment J. *Anal. Chem.*, **63**, 1425 (1991).
53. Jacobi U., Kaiser M., Toll R., Mangelsdorf S., Audring H., Otberg N., Sterry W., Lademann J. *Skin. Res. Technol.*, **13**, 19 (2007).
54. Choe C., Lademann J., Darvin M.E. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **28**, 318 (2015).
55. Галактионов И.В., Кудряшов А.В., Шелдакова Ю.В., Бялко А.А., Борсоны Ж. *Квантовая электроника*, **47**, 32 (2017) [*Quantum Electron.*, **47**, 32 (2017)].
56. Барун В.В., Иванов А.П. *Квантовая электроника*, **47**, 371 (2017) [*Quantum Electron.*, **47**, 371 (2017)].
57. Schleusener J., Carrer V., Patzelt A., Lademann J., Darvin M.E. *Laser Phys. Lett.*, **14**, 125601 (2017).
58. 2013 R: A Language and Environment for Statistical Computing Vol. 3. (Vienna, Austria).
59. Bocklitz T., Walter A., Hartmann K., Rosch P., Popp J. *Analytica Chim. Acta*, **704**, 47 (2011).
60. Guo S., Bocklitz T., Popp J. *Analyst*, **141**, 2396 (2016).
61. Liland K.H., Mevik B.H. 2015 Baseline: Baseline Correction of Spectra, R package version 1.2-1.
62. Mullen K.M. 2015 ALS: Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares (MCR-ALS), R package version 0.0.6.
63. Ilchenko O.O., Pilgun Y.V., Reynt A.S., Kutsyk A.M. *Ukr. J. Phys.*, **61**, 519 (2016).
64. Mercer E.H. *The Biology of Hair Growth* (USA, New York: Acad. Press, p. 113, 1958).
65. Voloshina O.V., Shirshin E.A., Lademann J., Fadeev V.V., Darvin M.E. *Indoor Air*, **27**, 377 (2017).
66. Williams A.C., Edwards H.G.M., Barry B.W. *J. Raman Spectrosc.*, **25**, 95 (1994).
67. Stone N., Kendall C., Smith J., Crow P., Barr H. *Faraday Discuss.*, **126**, 141 (2004).
68. Frushour B.G., Koenig J.L. *Biopolymers*, **14**, 649 (1975).
69. Silveira L., Jr., Silveira F.L., Bodanese B., Zangaro R.A., Pacheco M.T.T. *J. Diomed. Opt.*, **17**, 077003 (2012).
70. Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Priezhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E. *Sci. Rep.*, **7**, 1171 (2017).
71. Czekalla C., Schonborn K.H., Doge N., Jung S., Darvin M.E., Lademann J., Meinke M.C. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **30**, 260 (2017).
72. Sdobnov A.Y., Tuchin V.V., Lademann J., Darvin M.E. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **50**, 285401 (2017).
73. Генина Э.А., Ксенофонтова Н.С., Башшкатов А.Н., Терентюк Г.С., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **47**, 561 (2017) [*Quantum Electron.*, **47**, 561 (2017)].
74. Blume-Peytavi U., Vogt A. *Br. J. Dermatol.*, **165**, Suppl. 2, 13 (2011).