

## Визуализация распределения меланина и индоцианина зеленого внутри биоткани

Э.А.Генина, И.В.Федосов, А.Н.Башкатов, Д.А.Зимняков, Г.Б.Альтшулер, В.В.Тучин

*Для исследования распределения эндогенных и экзогенных красителей внутри биоткани разработана экспериментальная установка, которая представляет собой двухволновый лазерный сканирующий микрофотометр с высоким спектральным и пространственным разрешением. Исследованы образцы волос и биопсии кожи с волосными фолликулами, окрашенные индоцианином зеленым. По измеренным значениям коэффициентов оптического пропускания восстановлено пространственное распределение индоцианина зеленого и меланина внутри биоткани.*

**Ключевые слова:** визуализация, двухволновый лазерный сканирующий микрофотометр, меланин, индоцианин зеленый.

### 1. Введение

Лазерные источники излучения все более широко применяются в медицине и косметологии. Наряду с быстрым развитием диагностических методов, таких как оптическая когерентная томография [1], лазерная флуоресцентная спектроскопия [2], конфокальная и многофотонная флуоресцентная микроскопия [3, 4], в центре внимания исследователей находятся новые технологии лазерной терапии и хирургии. Среди них фотодинамическая терапия онкологических [5] и инфекционных [6] заболеваний, лазерный фототермолиз при лечении *acne vulgaris* [7] и других дерматологических заболеваний [8], лазерный фототермолиз в сочетании с локальной иммунотерапией раковых опухолей [9], коагуляция кровеносных сосудов [10], лазерная хирургия глаза [11], лазерная коррекция хрящевой ткани [12], эпиляция волос [13] и многие другие.

Для повышения контраста изображений исследуемых объектов при лазерной диагностике и для селективности лазерного воздействия на биоткань используются как эндогенные, так и экзогенные хромофоры. К их числу относятся меланин, гемоглобин, порфирины, а также фотосенсибилизаторы и биосовместимые красители, обладающие достаточно узкой полосой поглощения в области «терапевтического окна» (600–1200 нм), т. е. в диапазоне длин волн, в котором собственное поглощение биоткани сравнительно мало. Использование этих красителей требует детального изучения областей их локализации и распределения в биоткани. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные данной проблеме, изучение локализации красителей в биотканях остается актуальной задачей. Для этой цели применяются различные оптические методы, в частности спектроскопия комбинационного рассеяния [14], конфокальная микроско-

пия [4, 15], отражательная спектроскопия [16, 17], флуоресцентная спектроскопия [18, 19], фотоакустические методы [17], цифровой анализ оптических изображений [20–23] и другие.

В современной лазерной медицине индоцианин зеленый (ИЗ) – биосовместимый краситель с ярко выраженным пиком поглощения в ближней ИК области спектра (~800 нм) и более низким пиком в области ~720 нм – широко используется как для флуоресцентной диагностики функций печени, почек, сердца [24, 25], мозгового кровообращения [26, 27], так и для локализации опухолей [28, 29] посредством визуализации потоков крови в кровеносных сосудах, питающих опухоль. В многочисленных работах показана возможность использования ИЗ в качестве фотосенсибилизатора при фотодинамической терапии [7, 30]. Узкая полоса и высокий коэффициент поглощения красителя позволяют успешно применять его для фототермической терапии [7, 9], лазерной фотокоагуляции и сварки биотканей [11, 31]. В зависимости от растворителя и концентрации ИЗ в растворе максимум поглощения может изменяться в диапазоне 650–820 нм; это происходит также при его связывании с биологическими молекулами клеток [30, 32–34]. Точное согласование длины волны лазерного излучения и максимума полосы поглощения красителя обеспечивает высокую селективность их совместного воздействия, исключая повреждение здоровой биоткани. При этом важно знать распределение красителя в биоткани для оптимальной дозиметрии и локализации лазерного излучения.

Визуализация ИЗ в коже по спектрам флуоресценции требует использования дорогостоящего оборудования [24–28]. Кроме того, для одновременного мониторинга содержания меланина и красителя в коже необходима микроспектрофотометрия в широком диапазоне длин волн. Благодаря доступности и относительно невысокой стоимости большое распространение получил метод визуализации с помощью цифрового анализа цветного изображения кожи [20–23]. Для повышения информативности и контрастности изображения используются поляризационные фильтры, которые позволяют либо улучшить качество наблюдения поверхностных особенностей кожи, либо наблюдать подповерхностные процессы, такие как эритема, пигментация, или элементы,

Э.А.Генина, И.В.Федосов, А.Н.Башкатов, Д.А.Зимняков, В.В.Тучин. Институт оптики и биофотоники Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: eagenina@optics.sgu.ru, zimnykov@sgu.ru  
G.B.Altshuler. Palomar Medical Technology Inc., 82 Cambridge St., Burlington 01803 MA, USA

Поступила в редакцию 20 апреля 2007 г., после доработки – 13 июля 2007 г.

такие как волосяные фолликулы и т. д. Однако этот метод часто дает только оценочные результаты.

Таким образом, задача визуализации и определения точной локализации эндогенных и экзогенных красителей внутри биоткани остается достаточно актуальной. Целью данной работы является разработка устройства для одновременной визуализации меланина и индоцианина зеленого в коже.

## 2. Методы и материалы

Экспериментальная установка создана на основе стандартного универсального бинокулярного микроскопа с увеличением  $60\times$  (рис.1). Лазерное излучение попадало на исследуемый образец, проходя через канал осветителя непрозрачных объектов и фокусируясь объективом микроскопа в пятно диаметром 2–10 мкм. Образец находился в иммерсионной жидкости с показателем преломления  $n = 1.5$  между предметным и покровным стеклами, которые фиксировались на подвижном столике. Столик приводился в движение двумя шаговыми двигателями, управляемыми компьютером. Перемещения производились в горизонтальной плоскости во взаимно перпендикулярных направлениях с шагом 10 мкм.

Для нахождения коэффициента пропускания образца биоткани использовались два фотоприемника. Для исследования интенсивности падающего пучка его часть отклонялась тонкой стеклянной пластиной, введенной в приемный канал опорного фотоприемника. Измерительный фотоприемник (площадь фотодиода  $3 \times 3$  мм) находился непосредственно под образцом на расстоянии 1.5 мм и собирал рассеянный свет в широкой угловой апертуре ( $\sim 45^\circ$ ), которая определялась характеристиками фотоприемника. Сигналы с каждого фотодиода усиливались и оцифровывались с помощью АЦП (L-154, L-card, Россия) и поступали на персональный компьютер. В качестве источников излучения использовались два импульсных диодных лазера с длинами волн  $\lambda = 648$  и 783 нм. Выбор данных длин волн обусловлен тем, что последняя (783 нм) совпадает с максимумом поглощения используемого раствора ИЗ и в этом диапазоне поглоще-

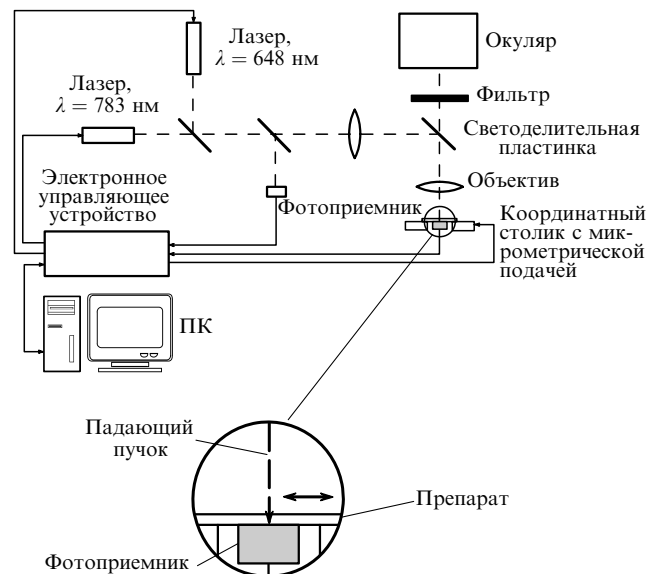


Рис.1. Схема двухволнового лазерного сканирующего микрофотометра.

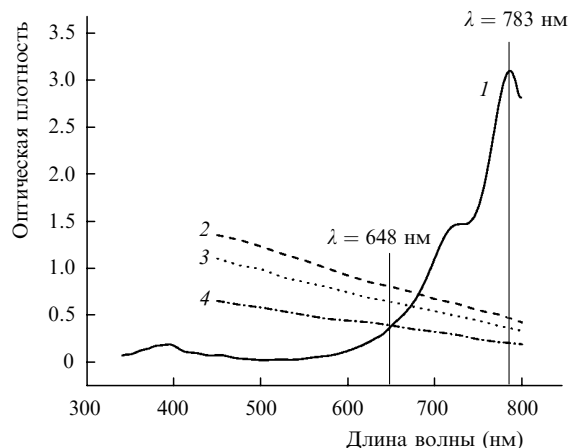


Рис.2. Спектральные зависимости оптической плотности раствора ИЗ (1) и волос [35] темно-каштанового (2), каштанового (3) и светлого желто-коричневого (4) цвета.

ние раствора красителя преобладает над поглощением меланина, содержащегося в волосах человека, а на  $\lambda = 648$  нм поглощение меланина, наоборот, преобладает над поглощением раствора ИЗ. Спектральные зависимости оптической плотности используемого раствора ИЗ [32] и волос человека [35] показаны на рис.2.

Лазеры попеременно генерировали серии импульсов (по 10 импульсов длительностью 1 мс и с периодом 2 мс). Одновременно с генерацией импульсов на компьютер через АЦП поступали сигналы с фотоприемников. Коэффициент пропускания объекта в каждой точке определялся как отношение сигналов измерительного и опорного фотодиодов. Это позволяло учесть флуктуации мощности фотодиода в процессе измерения.

Для минимизации влияния рассеяния биоткани показатели преломления образца биоткани и окружающей среды согласовывались за счет иммерсии для исключения рассеяния света на поверхности образца; прошедший через образец свет собирался в широкой угловой апертуре. Для калибровки измеряющей системы применялся сигнал от стекол с иммерсионной жидкостью между ними. Данная процедура давала возможность учесть потери сигнала, возникающие в результате поглощения излучения в стекле и иммерсионной жидкости, а также отражения излучения от границ раздела сред (воздух – стекло – иммерсионная жидкость – стекло – воздух).

Микрофотометр позволил определить коэффициент пропускания биоткани на двух длинах волн. При исследовании волос микрофотометр обеспечивал пространственное разрешение  $\sim 20$  мкм вдоль стержня волоса и 10 мкм поперек него. Для получения распределения сканирующий пучок совершал 30 перемещений поперек стержня волоса, при этом коэффициент пропускания в каждой точке определялся по усредненным коэффициентам пропускания, полученным при каждом поперечном сканировании.

Площадь сканирования и шаг выбирались индивидуально для каждого образца в зависимости от его размеров. В процессе сканирования записывался двумерный массив значений оптического пропускания образца на  $\lambda = 648$  и 783 нм.

Методика визуализации областей распределения красителя ИЗ в образце кожи включает несколько этапов:

1) по данным сканирования строятся изображения объекта на  $\lambda = 648$  и 783 нм, причем яркость  $B$  каждого

пиксела изображения, изменяющаяся в диапазоне 0–255, ставится в соответствие интенсивности прошедшего излучения. Таким образом, белый цвет, имеющий максимальную яркость 255, присваивается наибольшему значению интенсивности прошедшего излучения, черный цвет, имеющий яркость 0, соответствует отсутствию прошедшего сигнала;

2) определяется разностное изображение, т. е. значения интенсивности прошедшего излучения, полученные на  $\lambda = 783$  нм, вычитаются из полученных на  $\lambda = 648$  нм. Поскольку поглощение ИЗ на  $\lambda = 783$  нм превышает его поглощение на  $\lambda = 648$  нм и, следовательно, пропускание окрашенных участков на 648 нм значительно превышает их пропускание на 783 нм, окрашенные участки имеют положительные значения разностной интенсивности (разности). Для меланина, наоборот, пропускание на 648 нм меньше, чем на 783 нм, поэтому значения разности в тех областях, где присутствует меланин, будут отрицательными. (При визуализации областей локализации меланина разностное изображение получается вычитанием значений интенсивности, полученных на  $\lambda = 648$  нм из значений интенсивности, полученных на  $\lambda = 783$  нм. В этом случае положительными значениями разности будут обладать только участки, содержащие меланин.) Изображение строится в шкале градаций серого цвета, причем максимальному значению разности присваивается белый цвет, а минимальному – черный;

3) для более четкой визуализации красителя строится контрастное изображение, т. е. отрицательные значения интенсивности в разностном изображении приравниваются к нулю, и им на изображении присваивается черный цвет, а оттенки серого присваиваются только положительным значениям. Таким образом, на изображении остаются только участки, окрашенные ИЗ, что повышает контраст изображения.

Данная система подстраивается под каждое изображение биоткани, присваивая белый цвет наибольшему значению интенсивности, чтобы изображение получилось более контрастным.

Для исследования распределения меланина и красителя в коже *in vitro* использовались 7 образцов биопсии кожи добровольцев, предварительно окрашенной *in vivo* раствором ИЗ (Palomar Medical Products Inc., USA) [32]. В состав растворителя входят глицерин, пропиленгликоль, этиловый спирт и вода, что обеспечивает лучшее проникновение красителя в кожу. Максимум поглощения раствора находится на  $\lambda = 783$  нм. Биопсия кожи осуществлялась в клинике стандартным методом с применением местной анестезии при помощи специального оборудования для биопсии (Acuderm Inc., USA) из внешней области предплечья у двух здоровых добровольцев. Для исследования была выбрана кожа с темными волосами. Размеры образцов составляли 2 мм в диаметре и 4–5 мм в глубину.

Все исследуемые образцы дополнительно фотографировались с помощью микроскопической видеосистемы, совмещенной с персональным компьютером.

### 3. Результаты и обсуждение

Результат измерения коэффициента оптического пропускания и построения на его основе изображения отдельно взятого неокрашенного волоса демонстрируется на рис.3. Распределение коэффициента пропускания вдоль

оси волоса представлено на рис.3,а. Погрешность определения среднего значения коэффициента составила 5%. Хорошо видно, что коэффициент пропускания на  $\lambda = 648$  нм существенно ниже, чем на  $\lambda = 783$  нм. Это объясняется присутствием меланина, входящего в состав волоса и определяющего его поглощение. Спектр поглощения меланина не имеет ярко выраженных полос поглощения, и коэффициенты поглощения двух типов меланина – эумеланина и феомеланина – монотонно убывают с увеличением длины волны от 200 до 1100 нм [36, 37]. В ближней ИК области поглощение меланина становится незначительным.

На рис.3,б и в представлены изображения волоса на двух длинах волн. Более светлое изображение (рис.3,б) соответствует распределению коэффициента пропускания волоса для  $\lambda = 783$  нм, более темное (рис.3,в) – 648 нм. На изображениях хорошо видны темные участки в луковице и стержне волоса – характерные для растущего волоса участки с повышенным содержанием меланина. В области луковицы находятся функционирующие меланоциты – клетки, вырабатывающие меланосомы; здесь же происходит высвобождение меланина из меланосом. Впоследствии гранулы меланина фиксируются между фибриллами кератина в процессе роста и уплотнения волоса и таким образом распределяются по стержню волоса. Митотическая активность меланоцитов, выработка меланосом и их выделение в стержень волоса происходят только в активной фазе волосяного цикла [38].

Рис.4 демонстрирует этапы процесса получения контрастного изображения. На рис.4,а представлена микрофотография фрагмента эпилированного волоса в области фолликула. Волос был удален из кожи после нанесения на нее раствора ИЗ. Это изображение получено с помощью микроскопической видеосистемы, на нем можно увидеть окрашенные участки фолликула, однако точно определить глубину и границы областей окраски затруднительно. Рис.4,б и в показывают изображения волоса, построенные по значениям его коэффициента пропускания на  $\lambda = 648$  и 783 нм. Хорошо видно, что на рис.4,в участки фолликула, окрашенные ИЗ, выглядят значительно темнее, чем на рис.4,б, поскольку поглощение ИЗ на  $\lambda = 783$  нм превышает его поглощение на 648 нм. Для меланина, наоборот, пропускание на  $\lambda = 648$  нм меньше,

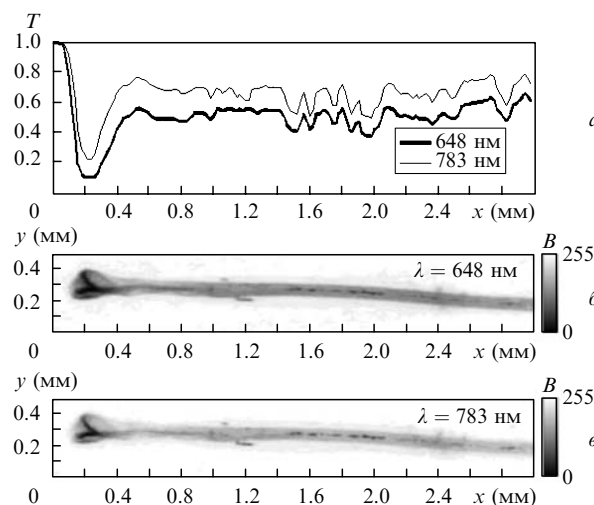


Рис.3. Распределение коэффициента оптического пропускания  $T$  волоса вдоль его оси (а), а также изображение волоса, построенное по значениям его пропускания на  $\lambda = 648$  (б) и 783 нм (в).

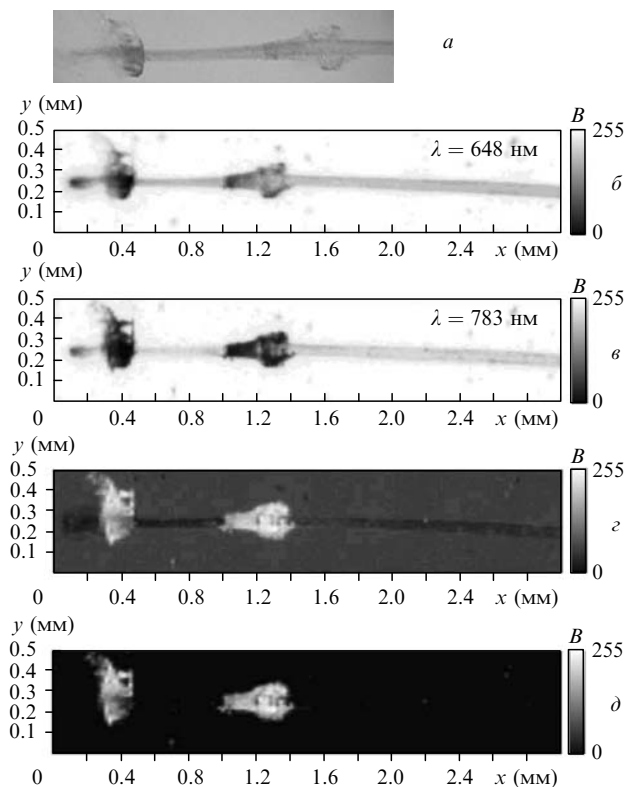


Рис.4. Изображения фрагмента волоса, окрашенного *in vivo* раствором ИЗ: микрофотография, полученная с помощью микроскопической видеосистемы (*a*); изображение волоса, построенное по значениям его коэффициента пропускания на  $\lambda = 648$  (*b*) и 783 нм (*c*); изображение волоса, построенное по разностной интенсивности на  $\lambda = 648$  и 783 нм (*d*) и контрастное изображение волоса, построенное по положительным значениям разностной интенсивности на  $\lambda = 648$  и 783 нм (*e*).

чем на 783 нм, поэтому стержень волоса на рис.4,*b* выглядит темнее, чем на рис.4,*c*. Таким образом, при вычитании значений интенсивности на 783 нм из значений интенсивности на 648 нм положительными значениями обладает только область, окрашенная ИЗ. Разностное изображение волоса показано на рис.4,*d*. Более точно определить границы распределения красителя в ткани можно, выделяя область с положительными значениями интенсивности оттенками серого цвета, а всю остальную область окрашивая черным цветом, таким образом значительно повышая контрастность изображения. Контрастное изображение волоса представлено на рис.4,*e*.

При исследовании кожи, окрашенной раствором ИЗ, четко различить области локализации красителя и точно определить границы его распределения внутри ткани еще более трудно, чем на отдельно взятом волосе, вследствие малой концентрации красителя внутри фолликула и значительного рассеяния света биотканью. Распределение ИЗ внутри образца кожи, полученное с помощью предложенной методики, показано на рис.5, который представляет собой микрофотографию фрагмента биопсии кожи с двумя волосяными фолликулами. На поверхность кожи добровольца предварительно наносился раствор ИЗ, втирался, а затем его остатки удалялись. Поскольку образец биопсии кожи представлял собой конус, вершина которого находилась в глубине, а основание на поверхности кожи, при накрывании образца покровным стеклом окрашенная поверхность кожи занимала область шириной около 0.2 мм в верхней части образца (на рис.5,*a*

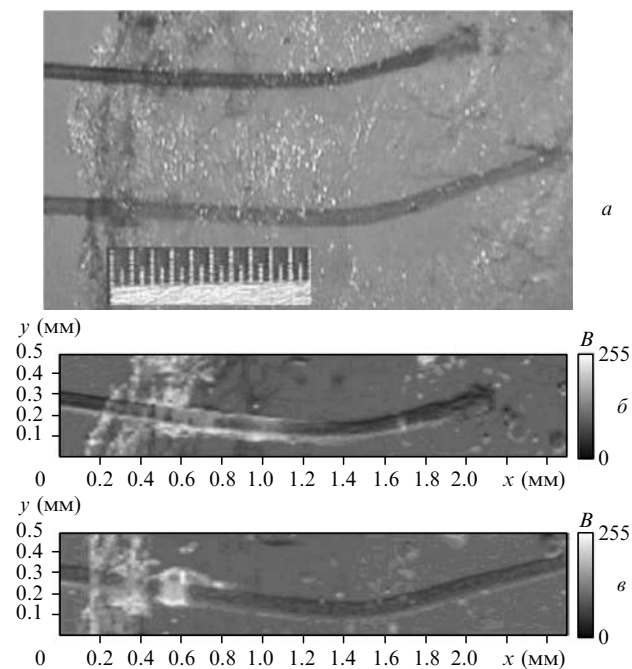


Рис.5. Изображение фрагмента биопсии кожи с волосами, окрашенными *in vivo* раствором ИЗ: микрофотография, полученная с помощью микроскопической видеосистемы (*a*), а также контрастные изображения верхнего (*b*) и нижнего (*c*) волоса.

это темная полоса по левому краю образца). Краситель распределялся также вдоль фолликулов и скапливался в области выхода сальной железы на глубине 0.2–0.3 мм от поверхности кожи. На рис.5,*a* окрашенные области выглядят более темными, однако границы области распределения красителя определить невозможно. Разностные изображения каждого фолликула, показанные на рис.5,*b* и *c*, позволяют уточнить глубину проникновения ИЗ внутрь фолликулов; она составляет  $0.93 \pm 0.02$  и  $0.59 \pm 0.02$  мм соответственно. В результате пространственного двухволнового сканирования и обработки полученных изображений четко видны области локализации меланина (темные области) в волосяных фолликулах и ИЗ (светлые области) на поверхности кожи и вдоль фолликула волоса. Таким образом, разностное изображение образца кожи оказывается значительно более информативным, чем микрофотография.

Существующие методы визуализации красителей в биотканях, такие как сканирующая конфокальная и флуоресцентная микроскопия, а также многофотонная микроскопия, обладают более высокой разрешающей способностью, достигающей 1–3 мкм [4, 15], однако они требуют дорогостоящего оборудования. Цифровой анализ изображений позволяет достаточно точно визуализировать окрашенные участки биотканей с четко очерченными границами [21, 22]. Однако при малой концентрации красителей, когда нет значительной дифференциации цвета окрашенного и неокрашенного участков биоткани, или при размытости границ окрашенного участка использование данного метода не позволяет получить достоверные результаты.

Пространственная разрешающая способность предложенного метода двухволнового лазерного сканирования зависит, прежде всего, от геометрических параметров лазерного пучка, зондирующего объект. Выбор же этих параметров определяется, в значительной мере,

толщиной исследуемого образца, с тем чтобы площадь поперечного сечения пучка по толщине образца изменялась незначительно. В настоящей работе исследовались образцы тканей толщиной от 30 до 70 мкм (волосы) и от 100 до 200 мкм (образцы биопсии кожи). Для того чтобы обеспечить однородность сечения лазерного пучка по толщине образца, лазерное излучение фокусировалось с перетяжкой диаметром около 10 мкм. Поскольку основными рассеивателями в волосе являются кератиноциты, меланоциты и пузырьки воздуха микронных и субмикронных размеров, то, согласно теории Ми, индикатриса прошедшего через образец излучения имеет ярко выраженный анизотропный характер, причем основная часть излучения рассеивается вперед. Использование широкоапертурного фотоприемника позволяет нивелировать влияние светорассеяния образцом биоткани на эффективность оценки поглощения. Более того, применение иммерсионной жидкости существенно снижает светорассеяние и повышает интенсивность прямопрошедшей компоненты излучения [39]. Геометрические параметры применяемой схемы рассчитывались исходя из оптических толщин волоса порядка 4–5, которые получены по данным работы [23]. В случае более тонких образцов возможна более жесткая фокусировка, обеспечивающая пространственное разрешение сканирующего микрофотометра до 1.5 мкм.

Показатель преломления используемой иммерсионной жидкости ( $n = 1.5$ ) можно считать постоянным в спектральном диапазоне 580–800 нм [40]. Иммерсионный агент, который имеет показатель преломления, близкий к показателю преломления основных рассеивателей кожи (коллагеновых волокон),  $n_{\text{col}} = 1.47$  [39], оказывает существенное влияние на ее рассеивающие свойства, снижая коэффициент рассеяния в результате согласования показателей преломления внутритканевой жидкости и коллагеновых волокон [39]. Показатель преломления кератиноцитов (основных составляющих волоса) равен 1.5 [41], поэтому иммерсионный агент значительно (в десятки раз) снижает рассеяние на поверхности волоса, вызванное неоднородностями его строения. Как было показано в [23], волосы темного цвета с высоким содержанием меланина обладают относительно слабо выраженными рассеивающими характеристиками по сравнению с другими типами волос ( $\mu'_s \sim 30$  и  $\sim 15 \text{ см}^{-1}$  (на  $\lambda = 648$  и 783 нм соответственно), где  $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$  – транспортный коэффициент рассеяния;  $\mu_s$  – коэффициент рассеяния;  $g$  – фактор анизотропии), что очевидно связано с размерами рассеивателей в волосах данного типа и более плотной их упаковкой. Применение иммерсии приводит к тому, что интенсивность прошедшего излучения будет определяться в основном поглощающими характеристиками структурных компонентов исследуемых биотканей. Однако меланин, имеющий показатель преломления 1.7 [42], по-прежнему будет вносить свой вклад в светорассеяние, что приведет к дополнительному повышению контраста изображения при визуализации распределения меланина. В то же время, влияние иммерсии на поглощающие свойства биоткани можно считать незначительным [39]. Таким образом, использование иммерсионной жидкости не вносит существенных искажений в визуализацию распределения красителей и пигментов в биоткани.

Другими факторами, определяющими пространственное разрешение, являются точность устройства пози-

ционирования образца, а также время регистрации одной точки изображения. В случае применения быстродействующих сканирующих устройств имеется возможность исследования протяженных образцов с очень высоким разрешением, так как размеры исследуемого образца ограничены только максимальным перемещением позиционирующего двухкоординатного столика. Так, в нашей системе максимальное перемещение столика достигает 100 мм с погрешностью 10 мкм, что позволяет исследовать образцы тканей, намного превышающие поле зрения обычного микроскопа.

Таким образом, метод пространственного двухволнового лазерного сканирования и обработки полученных изображений при достаточной простоте реализации может стать полезным в проведении исследований диффузии красителей в биотканях и определении границ областей локализации меланина и красителей внутри различных биологических структур.

#### 4. Заключение

Использование двухволнового лазерного сканирования позволило с достаточно высокой точностью определить пространственное распределение коэффициента пропускания биоткани на двух длинах волн и построить разностное изображение, разделяющее с высоким контрастом области локализации меланина и красителя в биоткани. Основным преимуществом применения предложенного метода является его низкая чувствительность к потерям зондирующего излучения, связанным с рассеянием на небольшие углы, поскольку апертура фотоприемника позволяет собирать большую часть рассеянного вперед излучения.

Описанное устройство и метод получения изображений образцов биотканей могут быть использованы для широкого круга приложений как в медицине, так и в биологии, в том числе для оптической диагностики, фотодинамической и лазерной терапии, исследований распределения в биологических структурах природных пигментов и некоторых органических красителей, в частности индоцианина зеленого.

Работа выполнена при поддержке Palomar Medical Technologies Inc. (Burlington, USA), U.S. Civilian Research & Development Foundation for the Independent States of the Former Soviet Union (grants REC-006, PG05-006-2) и РФФИ (проект № 06-02-16740).

1. Moger J., Matcher S.J., Winlove C.P., Shore A. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38**, 2597 (2005).
2. Zhu B., Jaffer F., Ntziachristos V., Weissleder R. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38**, 2701 (2005).
3. Gerger A., Koller S., Kern T., Massone C., Steiger K., Richtig E., Kerl H., Smolle J. *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 493 (2005).
4. Masters B.R., So P.T.C. *Opt. Express*, **8**, 2 (2001).
5. Странадко Е.Ф., Иванов А.В. *Биофизика*, **49**, 380 (2004).
6. Genina E.A., Bashkatov A.N., Chikina E.E., Knyazev A.B., Mareev O.V., Tuchin V.V. *Laser Phys.*, **16**, 1128 (2006).
7. Tuchin V.V., Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., Altshuler G.B. *Lasers Surg. Med.*, **33**, 296 (2003).
8. Ackermann G., Hartmann M., Scherer K., Lang E.W., Hohenleutner U., Landthaler M., Baumler W. *Lasers Med. Sci.*, **17**, 70 (2002).
9. Chen W.R., Liu H., Carubelli R., Nordquist R.E. *J. X-Ray Sci. Technol.*, **10**, 225 (2002).
10. Dai T., Diagaradjane P., Yaseen M.A., Pikkula B.M., Thomsen S., Anvari B. *Lasers Surg. Med.*, **37**, 210 (2005).
11. Kuo P.-Ch., Peyman G.A., Men G., Bezerra Y., Torres F. *Lasers Surg. Med.*, **35**, 157 (2004).

12. Zuger B.J., Ott B., Mainil-Varlet P., Schaffner Th., Clemence J.-F., Weber H.P., Frenz M. *Lasers Surg. Med.*, **28**, 427 (2001).
13. Campos V.B., Dierickx C.C., Farinelli W.A., Lin T.-Y.D., Manuskiatti W., Anderson R.R. *Lasers Surg. Med.*, **26**, 177 (2000).
14. Huang Z., Lui H., Chen X.K., Alajlan A., McLean D.I., Zeng H. *J. Biomed. Opt.*, **9**, 1198 (2004).
15. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R.H., Anderson R.R. *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 946 (1995).
16. Stamatas G.N., Zmudzka B.Z., Kollias N., Beer J.Z. *Pigment Cell Res.*, **17**, 618 (2004).
17. Viator J.A., Komadina J., Svaasand L.O., Aguilar G., Choi B., Nelson J.S. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1432 (2004).
18. Juzenas P., Iani V., Bagdonas S., Rotomskis R., Moan J. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **61**, 78 (2001).
19. Andrejevic-Blant S., Major A., Ludicke F., Ballini J.-P., Wagnieres G., van den Bergh H., Pelte M.-F. *Lasers Surg. Med.*, **35**, 276 (2004).
20. Takamoto T., Schwartz B., Cantor L.B., Hoop J.S., Steffens T. *Current Eye Res.*, **22**, 412 (2001).
21. Miyamoto K., Takiwaki H., Hillebrand G.G., Arase S. *Skin Res. Technol.*, **8**, 227 (2002).
22. Faziloglu Y., Stanley R.J., Moss R.H., van Stoecker W., McLean R.P. *Skin Res. Technol.*, **9**, 147 (2003).
23. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **36**, 1111 (2006).
24. Green F.J. *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators* (Milwaukee: Aldrich Chemical Company, Inc., 1990).
25. Dorshow R.B., Bugaj J.E., Burleigh B.D., Duncan J.R., Johnson M.A., Jones W.B. *J. Biomed. Opt.*, **3**, 340 (1998).
26. Springett R., Sakata Y., Delpy D.T. *Phys. Med. Biol.*, **46**, 2209 (2001).
27. Kohl-Bareis M., Obrig H., Steinbrink J., Malak J., Uludag K., Villringer A. *J. Biomed. Opt.*, **7**, 464 (2002).
28. Li X., Beauvoit B., White R., Nioka S., Chance B., Yodh A. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2389**, 789 (1995).
29. Bugaj J.E., Achilefu S., Dorshow R.B., Rajagopalan R. *J. Biomed. Opt.*, **6**, 122 (2001).
30. Abels C., Fickweiler S., Weiderer P., Baumler W., Hofstadter F., Landthaler M., Szeimies R.-M. *Arch. Dermatol. Res.*, **292**, 404 (2000).
31. Athiraman H., Wolf R.F., Bartels K.E., Shivakoti S., Liu H., Chen W.R. *J. X-Ray Sci. Technol.*, **12**, 117 (2004).
32. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P., Kochubey V.I., Lakodina N.A., Altschuler G.B., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **7**, 471 (2002).
33. Weersink R.A., Hayward J.E., Diamond K.R., Patterson M.S. *J. Photochem. Photobiol.*, **66**, 326 (1997).
34. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Кочубей В.И., Тучин В.В., Альтшулер Г.Б. *Письма в ЖТФ*, **27**, 63 (2001).
35. Nicholls E.M. *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **32**, 15 (1968).
36. Jacques S. <http://omlc.ogi.edu/spectra/melanin/index.html>
37. Menon I.A., Persad S., Haberman H.F., Kurian C.J. *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 202 (1983).
38. Рук А., Даубер Р. *Болезни волос и волосистой части головы* (М.: Медицина, 1985).
39. Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood* (Bellingham: SPIE Press, 2005, Vol. PM154).
40. Фихман Б.А. *Микробиологическая рефрактометрия* (М.: Медицина, 1967).
41. Chan D., Schulz B., Rubhausen M., Wessel S., Wepf R. *J. Biomed. Opt.*, **11**, 014029 (2006).
42. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R.H., Anderson R.R. *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 946 (1995).