

OCT评估超声介导下表皮真皮层的光学参数变化规律的研究

张 凯, 房文汇*, 王玥琳, 王紫来

长春理工大学物理学院, 吉林 长春

收稿日期: 2024年4月26日; 录用日期: 2024年6月10日; 发布日期: 2024年6月17日

摘要

皮肤是光学成像诊断的主要靶器官之一, 但皮肤组织的高散射特性限制了光学相干层析成像技术(OCT)的成像深度和扫描精度。利用高频超声结合光学透明剂对离体皮肤组织进行实时处理, 协同光学透明剂进入生物组织。实验对比两种处理模式下的离体皮肤的OCT的相关参数的变化。PVP粘性改良80%PEG-400/PEG-200结合频率为1 MHz、功率1 W/cm²的高频超声处理离体皮肤组织后, 真皮层散射系数在60分钟内降低0.27, 与对照组相比, 同比增加了3.3倍。证明高频超声能够有效改善OCAs的皮肤组织光学清除效率, 提升OCT光学成像效果。

关键词

图像处理, 光学相干层析技术, 光学透明剂, 超声波促渗

Study on the Variation of Optical Parameters of Ultrasound-Mediated Epidermal Dermis Evaluated by OCT

Kai Zhang, Wenhui Fang*, Yuelin Wang, Zilai Wang

School of Physics, Changchun University of Science and Technology, Changchun Jilin

Received: Apr. 26th, 2024; accepted: Jun. 10th, 2024; published: Jun. 17th, 2024

Abstract

Skin is one of the main target organs for optical imaging diagnosis, but the high scattering proper-

*通讯作者。

ties of skin tissue limit the imaging depth and scanning accuracy of optical coherence tomography (OCT). Real-time processing of isolated skin tissues using high-frequency ultrasound combined with optical hyaluronics synergizes optical hyaluronics into biological tissues to improve the optical clearance of skin tissues. The changes in the relevant parameters of OCT of isolated skin in the two treatment modes were compared in the experiment. The dermal scattering coefficient decreased by 0.27 within 60 minutes after PVP viscosity-modified 80% PEG-400/PEG-200 combined with high-frequency ultrasound at a frequency of 1 MHz and a power of 1 W/cm² was used for the treatment of isolated skin tissues. This is a year-on-year increase of 3.3-fold when compared with that of the control group. This result demonstrates that high-frequency ultrasound can effectively improve the optical removal efficiency of skin tissues with OCAs and enhance OCT optical imaging.

Keywords

Image Processing, Optical Coherence Tomography, Optical Clearing Agents, Sonophoresis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

光学相干层析成像技术(Optical Coherence Tomography, OCT)是一种非接触式、非侵入性且具有高分辨率的成像技术[1] [2]，该技术由 Huang 等人于 1991 年首次提出[3]，作为一种新型的成像技术，OCT 的应用领域已由最初的眼科逐渐拓展到牙科[4]、皮肤科[5]、胃肠[6] [7]、肿瘤[8]以及心血管[9] [10]等领域。

大量研究已经证明通过引入高渗透性、高折射率、生物相溶性较好的光学透明剂(Optical Clearing Agents, OCAs)能够有效降低生物皮肤组织内的随机光散射[2] [11] [12] [13]，通过施加光学透明剂之后引起皮肤组织内部的折射率匹配、脱水作用和胶原蛋白解离三大机制能够实现提升皮下光穿透深度的效果。然而由于皮肤组织的特殊功能性，即角质层(Stratum Corneum, SC)的高度有序的脂质双层结构所呈现的坚固的渗透性屏障，经皮途径的药物传递受到严重限制[14]。为了降低光学清除过程中皮肤的屏障功能，已经研究了各种非侵入性技术，目的是通过暂时干扰 SC 结构来增加皮肤渗透性。化学渗透增强剂以及物理渗透增强手段已被证明可以加速 OCA 的表皮渗透性。经皮给药(Transdermal Drug Delivery, TDD)中经典的化学渗透增强剂，如二甲基亚砜(DMSO) [15]、油酸[16]和氮酮(Azone) [17]等，已显示出加速 OCA 的皮肤渗透性。而物理渗透增强方法包括离子透入[18]、电穿孔[19]、声透入[20]、微针[21]、激光消融[22]和射频消融[23]。

在众多物理方式中，超声(Sonophoresis, SP)作为一种无创的物理方法，是一种十分有前景的物理治疗方法，当局部应用 OCAs 结合超声时，显示出皮肤组织光学清除增强的效果[24]。由于具有端羟基的化学试剂有较高的光学清除潜力(Optical Clearing Potential, OCP)，分子量更小的小物质更容易穿透皮肤，已有大量的研究报道了小分子通过皮肤的声泳传递。它代表了一种有效的非侵入性物理方法来提高表皮通透性[25] [26]。我们最近的研究表明，局部应用粘性光学透明剂结合超声，可有效提升皮肤组织近红外波段光谱强度。由于耦合介质的配方也是声泳过程中一个非常重要的变量。即耦合介质的粘度、表面张力、密度、声阻抗以及其他体积和界面性质都可以在决定超声处理后观察到的皮肤渗透性增强程度方面发挥重要作用[27]。耦合溶液具有与皮肤相似的声阻抗，使得超声波在皮肤与耦合介质的界面处没有明显的反

射。因此，在对醇类光学透明剂做试剂粘性改良之后，结合超声对离体猪皮组织处理，超声诱导的猪离体皮肤和人体内皮肤 OCT 成像深度和对比度明显增强。证明使用超声方法增强皮肤光透明度是可行的。在这项研究中，我们利用光学相干层析评估离体猪皮肤的光透明度，为证明超声传输是一种有前途的无创方法提供实际依据。

2. 实验部分

2.1. 皮肤样本制备

在获取新鲜猪皮组织后，去除多余的皮下组织，每个样本皮肤的横向尺寸为 2 cm (± 0.2 mm)，切割后用两片载玻片交叉叠加，用游标卡尺测量样品四个角的厚度。所有样品在 8 小时内使用完毕。

2.2. 化学试剂制备

选择 PEG-200、PEG-400 两种的醇类试剂作为 OCA。实验中取适量醇类试剂，加入 5% 聚乙烯吡咯烷酮(PVPK88-96) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司) 65℃恒温搅拌至透明无气泡状态后，冷却至室温备用。

2.3. 仪器及参数

(1) 实验采用的 SD-OCT 系统(美国 Thorlabs 公司，型号：TELESTO)的中心波长 1300 nm，理论轴向分辨率 5.5 μm，扫描速率最高可达 91 KHz。扫描启动后，A 扫描视图中 x 轴是以 dB 为单位的信号强度，y 轴是以 mm 为单位的深度。

(2) 使用 UT1041 超声波发生源(中国深圳市东迪欣科技有限公司)，工作频率 1 MHz，超声强度 1 W/cm²，实验中采用 1 cm² 发射头结合粘性改良 OCAs 对样本处理 5 min 后静置 5 min，并利用 OCT 实时记录。

3. 结果与讨论

图 1 显示局部应用 80%PEG-200/PEG-400，对照组及超声组 0、20、40、60 分钟时猪皮 OCT 成像效果图，其中不同颜色代表局部信号强度。由于皮肤的高散射性，光子穿透皮肤的能力变差，信号强度强逐随皮肤深度增加渐降低。随着作用时间增加，光学透明剂渗透到皮肤组织内，皮肤表层 OCT 信号强度逐渐降低，表面该层组织光散射减弱。

值得注意的是，不同的化学物质在不同类型的组织中具有不同的扩散速率。由于化学物质扩散的速度，皮肤组织最外层将首先被光学清除。随着试剂的持续渗透，真皮层内部水分在渗透压作用下移动到组织外，此时真皮层内胶原结构由于结合水流出，变得更加紧致，使得更多光子得以穿透生物组织，从而增加组织深层的信号强度，OCT 图像对比度增加。这一阶段后，由于组织细胞水分大量析出导致组分内部再次失衡，皮肤发生再水化过程，水分再次进入组织内部，随后在某一点达到组分内部的平衡。如图 1 (D.60 min)，皮肤组织由于多次皱缩拉伸过程出现组织空洞以及分层现象，此时图像对比度会有所下降。治疗 60 分钟后，成像深度从 1.1 毫米增加到 1.7 毫米，几乎与 80% PEG-200 超声组在 20 分钟左右时达到的水平相同。

这里的皮肤通透性增强效果可能是由于角质层间隙或皮肤附属物(如毛囊)内的空化，振荡空化气泡的直接相互作用导致角质层脂质双层的紊乱或解体，降低了角质层细胞膜屏障功能[28]。相关研究早已证明，在哺乳动物皮肤结构中，渗透性与 SC 细胞间脂质烷基链的构象紊乱有直接关系，当皮肤经 US 作用后，SC 脂质层被部分或完全去除后，OCAs 试剂透皮运输能力增强导致 OCT 成像效果提升是十分合理的，

该结论与本文实验结果一致。也有研究表明在高频超声的作用下，角质层中脂质会被提取到耦合介质中去，从而导致观察到的皮肤通透性增加，在超声导入中起主导作用(图 2)。

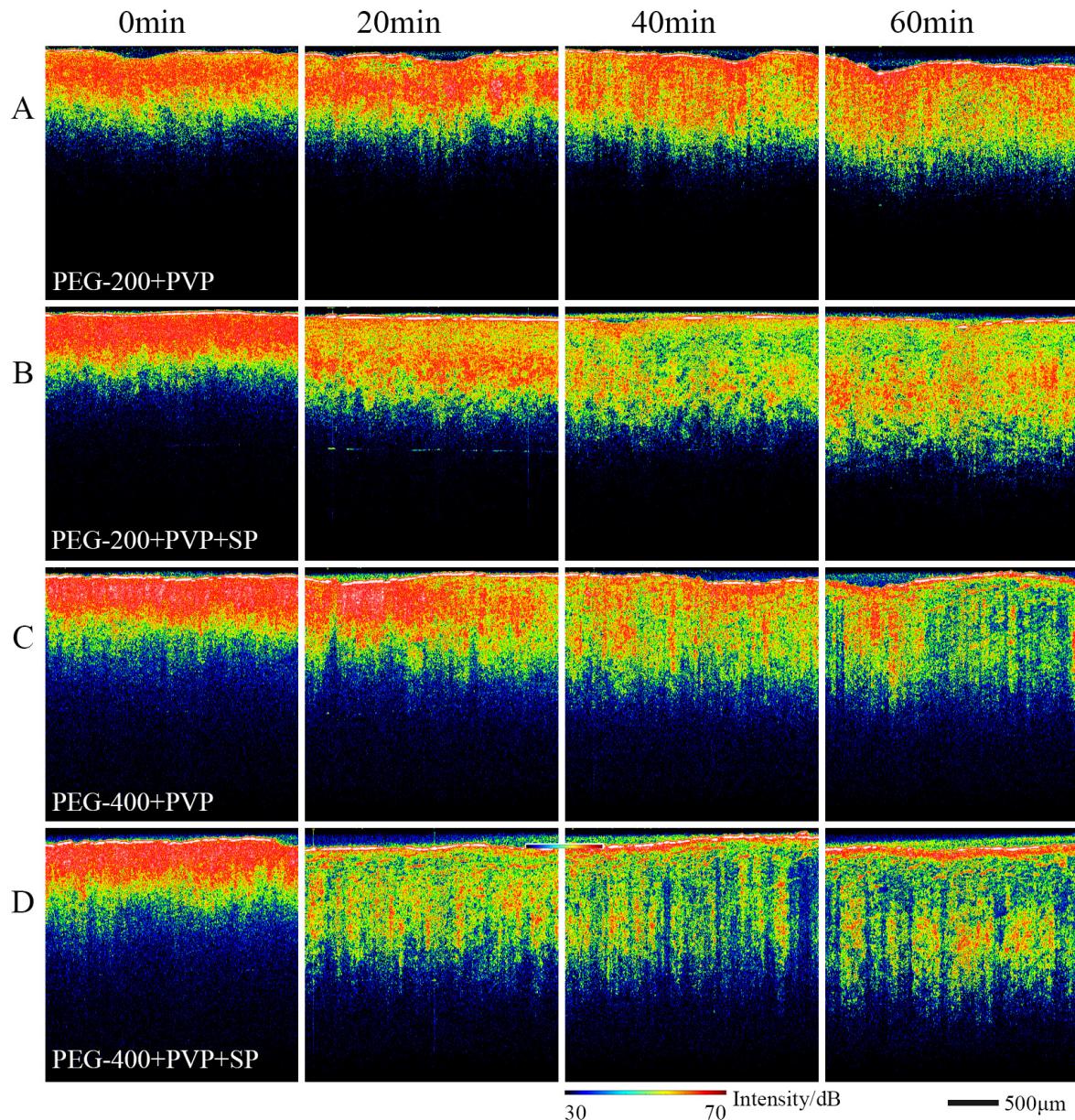
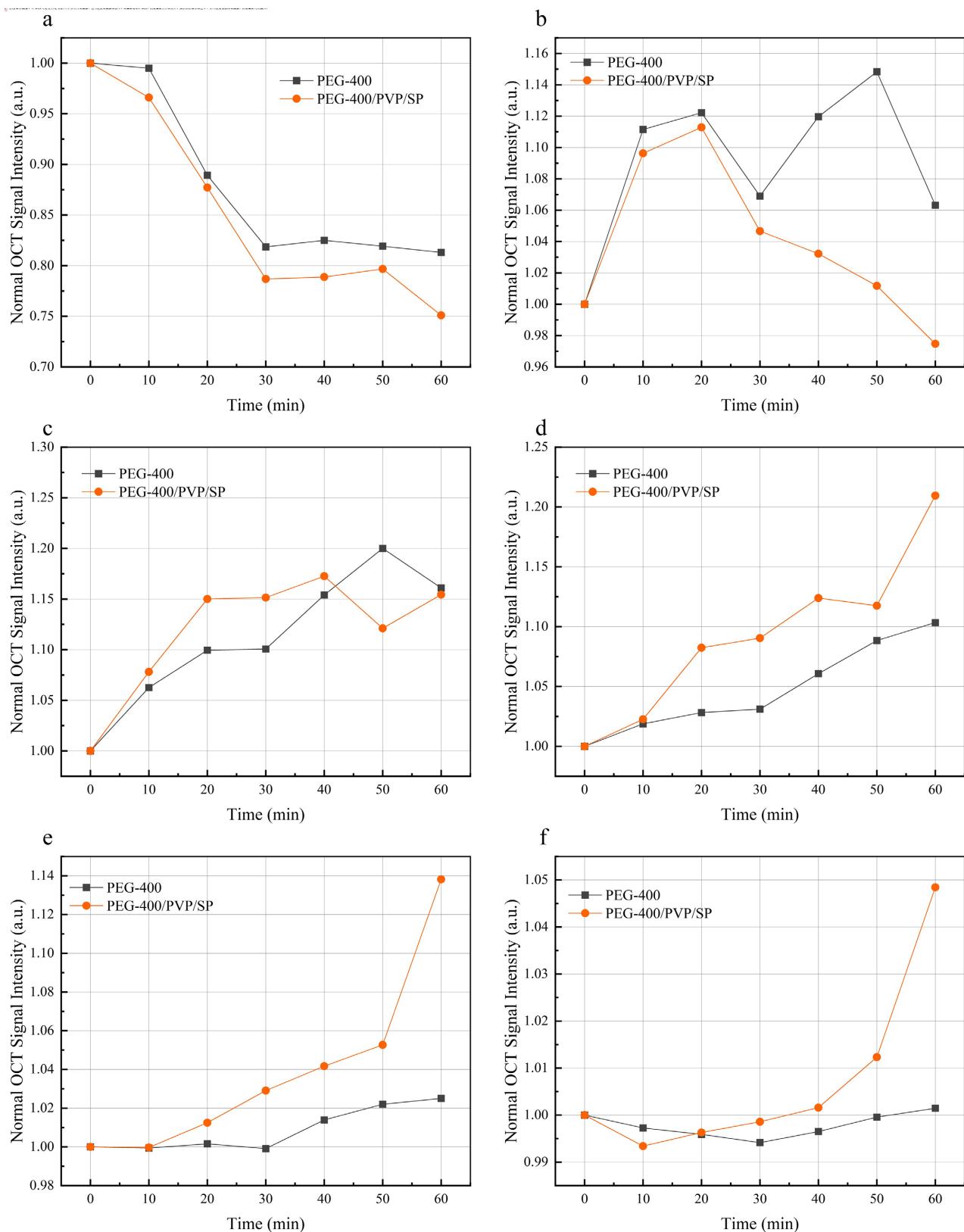


Figure 1. OCT pictures of simple
图 1. OCT 成像效果图

为定量分析超声协同 PVP 改良 OCAs 对 OCT 信号幅值的影响, 图 3(a)展示了对照组与超声组归一化信号强度随深度变化的曲线。从图中可以看出, 在超声的作用下, OCT 信号强度呈现增长幅度大于对照组, 与图 1 二维图像的对比度变化呈现高度一致性, 证明了生物组织在超声波的协同作用下, 增加 OCAs 在组织中的渗透, OCT 信号强度较其他处理方式要更强。鉴于 OCT 图像的二维、三维像素点分布形式, 可以使用信号强度和半峰宽(FWHM)值评估图像对比度与单个水平部分的平均强度, 他们的比值 R 计算公式为:

**Figure 2.** Normalized OCT-signal (a) 0.2 mm; (b) 0.4 mm; (c) 0.6 mm; (d) 0.8 mm; (e) 1.0 mm; (f) 1.2 mm**图 2.** 归一化信号强度 (a) 0.2 mm; (b) 0.4 mm; (c) 0.6 mm; (d) 0.8 mm; (e) 1.0 mm; (f) 1.2 mm

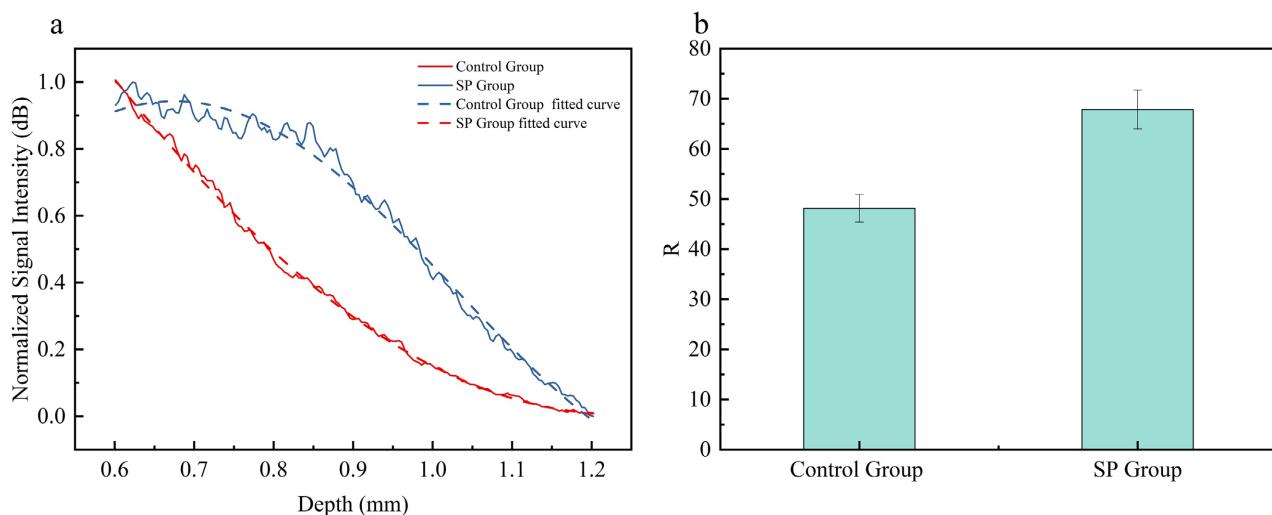


Figure 3. (a) Changes in OCT signal intensity of isolated porcine skin tissues treated with 80% PEG-200, (b) Changes in R-value at 60 min of treatment in control and ultrasound groups (Control Group: PEG-200, SP Group: PEG-200/PVP/SP)

图3. (a) 离体猪皮组织经 80% PEG-200 处理后 OCT 信号强度变化,(b) 对照组与超声组处理 60 min 时 R 值变化(对照组: PEG-200, 超声组: PEG-200/PVP/SP)

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

如图 3(b)所示, 通过比较 60 min 时 OCT 信号强度平均值与半峰宽的比值, 可以直观的看出, 在超声的作用下, 皮肤组织真皮层深度处的 R 值相较其他两种处理方式分别提升了 41% 和 34%, R 值整体水平都得到有效的提升。

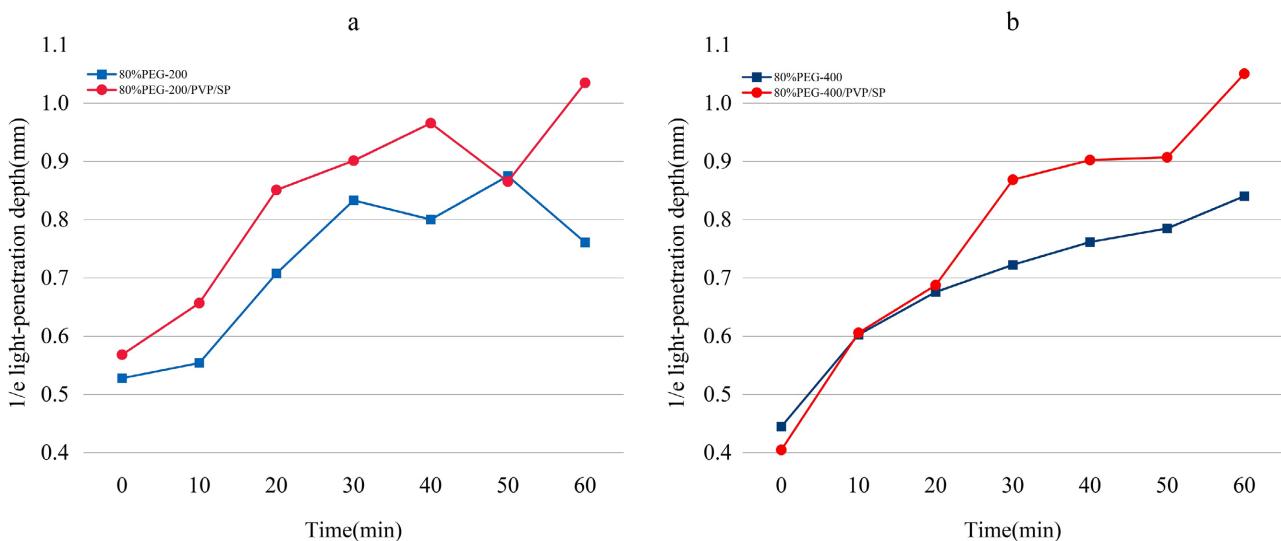


Figure 4. Changes in 1/e light penetration depth of pig skin tissue after ultrasound and control treatments

图4. 超声组和对照组处理后猪皮组织 1/e 光穿透深度变化

用 MATLAB 程序对 OCT 图像横向成像范围的线性信号强度进行处理, 平均后获得了皮肤组织强度深度相关数据。将覆盖表皮和真皮深度的最佳拟合指数曲线应用于平均和归一化信号强度数据, 并基于此数据计算相应的 1/e 光穿透深度。图 4 分别为 PEG-200、PEG-400 两种处理模式下样本皮肤的 1/e 光穿

透深度的动态变化,皮肤光透明度的增加有助于提升 OCT 无创诊断的精度,参照图 1 的可以看出光子在未经处理的皮肤中穿透深度有限。

图 4 中 a、b 图,0 分钟时,80% PEG-200 处理的样本皮肤的光穿透深度为 0.53 mm,相同模式下 PEG-400 处理后光穿透深度为 0.45 mm。而经过超声处理 60 min 后,光穿透深度大大增加,如图 2(b)所示,经超声处理后,1/e 光穿透深度由最初的 0.41 mm 增加至 1.05 mm。同样的超声处理模式下,60 min 时,PEG-200 SP Group 与 Control Group 样本皮肤光穿透深度相比增加了 1.35 倍。

光在组织中传输遵循 Lambert-Beer 定律[29],使用 OCT 强度深度的曲线拟合来衰减系数,假设衰减系数在特定深度上是相似的,光子穿过生物组织并返回 OCT 的检测臂,相干光束的衰减系数表示为:

$$I_z = I_0 e^{-\mu_s z_s} \quad (2)$$

为计算散射系数,将公式两边同时取对数,采用线性最小二乘拟合方法,计算不同层归一化一维强度曲线在特定深度下的斜率作为散射系数,定量的说明了超声波对生物组织散射系数的影响,即:

$$\ln I_z = \ln I_0 - \mu_s z_s$$

$$\mu_s = -\ln \left(\frac{I_z}{I_0} \right) / z_s \quad (3)$$

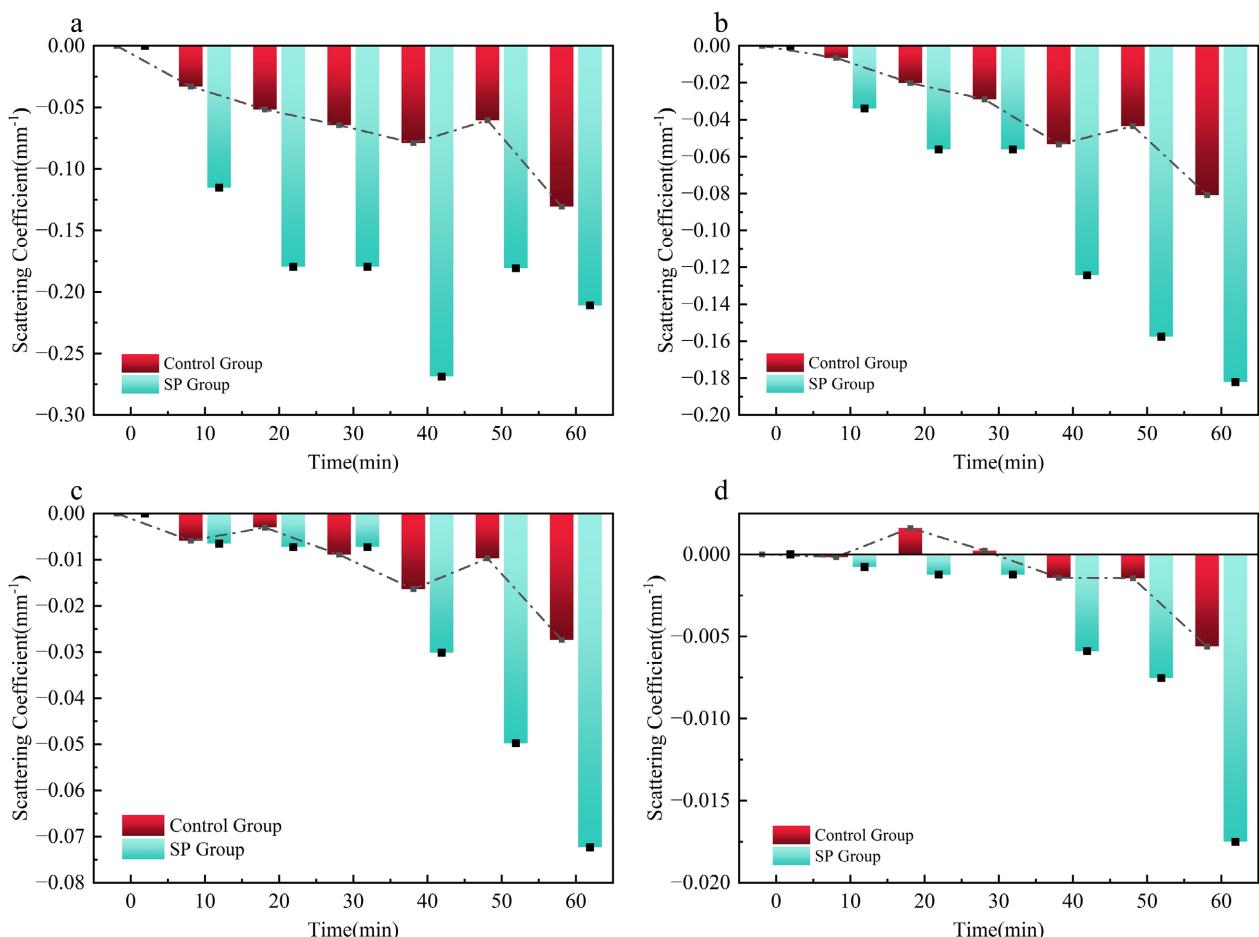


Figure 5. Variation of scattering coefficient at different depths of the skin under the effect of 80% PEG-200 (a) 0.6 mm; (b) 0.8 mm; (c) 1.0 mm; (d) 1.2 mm

图 5. 80% PEG-200 作用下皮肤不同深度散射系数变化 (a) 0.6 mm; (b) 0.8 mm; (c) 1.0 mm; (d) 1.2 mm

图 5 展示了在离体猪皮局部应用 80% PEG (Control Group I)、80% PEG/PVP (Control Group II) 和 80% PEG/PVP/SP (SPGroup) 后 0 至 60 分钟内散射系数变化。

按照皮肤组织的结构层次，可以将皮肤组织大致分为三个区域，浅层皮肤(0~0.4 mm)、中层皮肤(0.4~0.8 mm)以及深层皮肤(0.8~1.2 mm)。由于光学透明剂主要作用于皮肤组织真皮层，因此主要观察皮下 0.4 mm 深度以下的散射系数变化规律，即图 5 中(a, b, c, d)，从图中折线图可以看出，对照组中高浓度试剂对应的中层皮肤，散射系数呈规则的先下降后上升的趋势，近似表现为余弦函数的倒 S 形式，而皮肤组织的深层皮肤，散射系数呈先上升后下降的趋势，表现为正弦函数的曲线形式，这意味着生物组织的散射系数与生物组织的脱水高度相关，即在生物组织上表皮应用高浓度试剂后，生物组织内部发生的失水 - 吸水 - 再失水的过程(表 1)。

Table 1. Change in scattering coefficient of 80% PEG-200 in ultrasound group

表 1. 超声组 80% PEG-200 散射系数变化

Time/min	0.2 mm	0.4 mm	0.6 mm	0.8 mm
20 min	1.389671	0.111079	0.13544	0.07297
40 min	1.408635	0.263393	0.14192	0.14282
60 min	1.61627	0.356239	0.12234	0.17927

光学透明剂可以导致皮肤组织脱水，但是不同试剂的失水效果不同，如 PEG-400 的效果与 PEG-200 相比，失水相对弱。总而言之，实验表明生物组织光学透明效果的本质是由于真皮中的水流出，胶原蛋白结构收缩变得更加紧致引起折射率匹配，导致皮肤散射减少，与作者 Xiang Wen 提到甘油诱导下的皮肤光学透明的机制结论一致[14]。此外，通过观察超声组散射系数变化，发现超声的应用可以加速这一过程，并让生物组织的脱水过程更加稳定，如图 5(d)所示，在深层皮肤组织处，未经超声处理的样本皮肤散射系数减小幅度不大甚至在 1.2 mm 深度处还有所增长，在相同时间范围内，超声组散射系数随着时间的增加保持持续减小，此实验现象与结论，未见其他报道。

实验所用两种醇类试剂虽为小分子试剂，但考虑到角质层亲脂性的性质，渗透效率仍然较低。通过超声组与对照组 OCT 参数对比发现，在经超声处理后，组织光透明效果得到有效提升。超声所带来的透皮递送效果归因于高频声波在局部药物递送方面的热特性和非热特性，这两种效应都可以增加组织细胞的通透性。

高频超声所引起的热效应可以增加药物和细胞膜中分子的动能[30]，引发组织的生理反应，包括如下情况：1) 扩张皮肤的进入点(例如，毛囊和汗腺)，2) 增加药物化合物的动能加速药物扩散性，3) 促进药物吸收，和 4) 增强治疗区域的血液循环。这些生理变化有助于药物分子穿过角质层扩散，并被真皮中的毛细血管网收集。

与此同时，高频超声改变角质层的致密性质，从而使药物更容易透过皮肤扩散。首先，这种改变是通过角质层中的结构性蛋白变性、剥离或分层角质层的角质化层、改变细胞渗透性或改变富含脂质的角质细胞间结构来实现的。其次，当声波穿过组织时，声波与诸如振荡、辐射压力和细胞空化的非热机械效应相关联。这些机械效应可通过使组织和药物介质中的颗粒振荡、改变细胞膜的静息电位电位[31]、改变脂质结构[28]等，从而增加细胞渗透性、增加离子传导性或破坏细胞膜。这些效应中有一些与加热产生的效应相似。然而，声波在不协调组织中传播时，可能对细胞产生一些推拉作用，但辐射力或流动力不足以将药物分子推入组织中，因为在大多数情况下，在声波截止后，粒子会回到原来位置(图 6(b))。

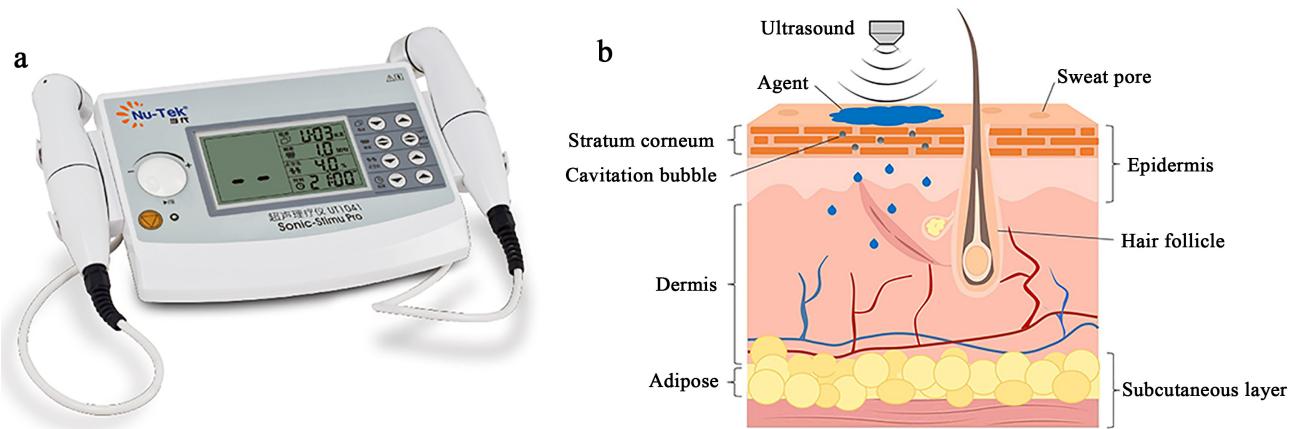


Figure 6. (a) Ultrasound instrument diagram; (b) Non inertial cavitation occurring within the stratum corneum
图 6. (a) 超声仪器图; (b) 角质层内发生的非惯性空化

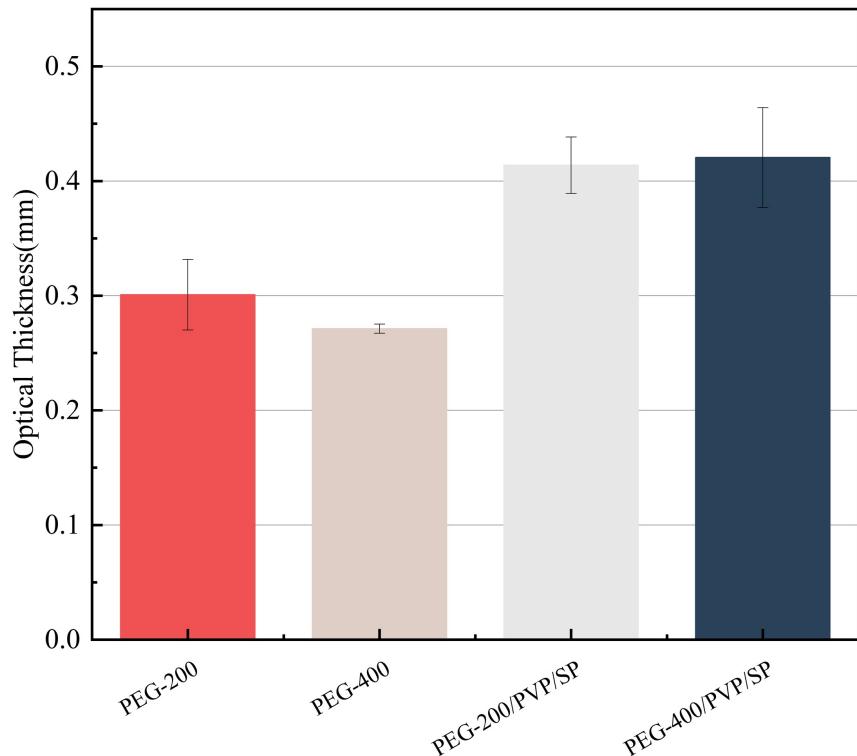


Figure 7. Changes in sample skin weight per unit time
图 7. 单位时间内样本皮肤重量变化

如上所述，由于角质层的特殊的功能性，使得生物组织的角质层成为阻碍试剂渗透的主要原因[32]。通过对醇类实验的数据的分析发现，光学透明剂作用的主要部位是位于角质层下方的真皮层，例如生物组织的脱水以及胶原蛋白的解离所引起的生物组织光学透明行为。因此能够增加光学透明剂作用于真皮层的效率就能大大提升皮肤组织的光透明效果，在涂抹光学透明剂的基础上，进一步应用超声的方式对生物组织进行处理，为光学透明剂渗透到真皮层创建更多的“通道”，从而达到增强组织光学透明效果的目的，通过实验的验证超声这种物理促渗方式是十分有效的，如图 7，经超声处理后的皮肤样本在同样的实验环境下失水量要更多。此外，超声波能量将进入皮肤组织更深层，相比于未经任何促渗操作的

皮肤组织，超声实时处理后的皮肤组织在真皮层深层也能保持较优的光穿透效果。

值得注意的是，在进行药物递送时，必须谨慎选择药物剂量和声波参数，以保证操作的安全性和有效性。此外，还需要进行更多的研究，以深入探讨超声在药物递送对 OCT 成像的提升效果。

4. 结论

通过对 OCT 对常规 OCAs 对照组、PVP 粘性改良 OCAs 对照组，以及超声波结合 PVP 粘性改良 OCAs 处理的样本进行实时记录和检测，讨论了在光学清除过程中应用高频超声对 OCT 光学参数的影响。发现经 80% PEG-200/PEG-400 处理，样本皮肤的光穿透深度为 0.53/0.45 mm，而经过超声结合改良 OCAs 处理后，光穿透深度分别提升至 1.04/1.05 mm。因此说明，高频超声与粘性改良后的 OCAs 具有良好的协同效应，能够缩短组织脱水时间，使皮肤组织各组分能够更快达到折射率匹配。与传统组织光学透明技术相比，超声协同粘性改良后的 PEG-200 与 PEG-400 可有效降低组织内部光散射，显著增加离体猪皮组织的 OCT 成像深度，为 OCT 在生物成像方面提供相关实验依据。

参考文献

- [1] 朱越, 高万荣. 全场高分辨生物组织光学层析成像[J]. 中国激光, 2014, 41(8): 114-121.
- [2] Olsen, J., Holmes, J. and Jemec, G.B.E. (2018) Advances in Optical Coherence Tomography in Dermatology—A Review. *Journal of Biomedical Optics*, **23**, Article ID: 040901. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.4.040901>
- [3] Huang, D., Swanson, E.A., Lin, C.P., Schuman, J.S., Stinson, W.G., Chang, W., et al. (1991) Optical Coherence Tomography. *Science*, **254**, 1178-1181. <https://doi.org/10.1126/science.1957169>
- [4] Dias-Moraes, M.C., Castro, P.A.A., Pereira, D.L., Ana, P.A., Freitas, A.Z. and Zezell, D.M. (2021) Assessment of the Preventive Effects of Nd: YAG Laser Associated with Fluoride on Enamel Caries Using Optical Coherence Tomography and FTIR Spectroscopy. *PLOS ONE*, **16**, e0254217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254217>
- [5] Bashkatov, A.N., Berezin, K.V., Dvoretskiy, K.N., Chernavina, M.L., Genina, E.A., Genin, V.D., et al. (2018) Measurement of Tissue Optical Properties in the Context of Tissue Optical Clearing. *Journal of Biomedical Optics*, **23**, Article ID: 091416. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.23.9.091416>
- [6] Otuya, D.O., Dechene, N.M., Poshtupaka, D., Judson, S., Carlson, C.J., Zemlok, S.K., et al. (2022) Passively Scanned, Single-Fiber Optical Coherence Tomography Probes for Gastrointestinal Devices. *Lasers in Surgery and Medicine*, **54**, 935-944. <https://doi.org/10.1002/lsm.23576>
- [7] Xu, W., Wang, Y., Huang, H., Wu, J., Che, Y., Ding, C., et al. (2022) Octreotide-Based Therapies Effectively Protect Mice from Acute and Chronic Gastritis. *European Journal of Pharmacology*, **928**, 174976. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174976>
- [8] Assayag, O., Grieve, K., Devaux, B., Harms, F., Pallud, J., Chretien, F., et al. (2013) Imaging of Non-Tumorous and Tumorous Human Brain Tissues with Full-Field Optical Coherence Tomography. *NeuroImage: Clinical*, **2**, 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.04.005>
- [9] Kakizaki, S., Otake, H., Seike, F., Kawamori, H., Toba, T., Nakano, S., et al. (2022) Optical Coherence Tomography Fractional Flow Reserve and Cardiovascular Outcomes in Patients with Acute Coronary Syndrome. *JACC: Cardiovascular Interventions*, **15**, 2035-2048. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2022.08.010>
- [10] 姚文涛, 高万荣. 内窥光学层析成像的发展和应用[J]. 激光与光电子学进展, 2018, 55(7): 20-33.
- [11] Yu, T., Zhu, J., Li, D. and Zhu, D. (2021) Physical and Chemical Mechanisms of Tissue Optical Clearing. *iScience*, **24**, Article ID: 102178. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102178>
- [12] Tuchin, V.V. (2005) Optical Clearing of Tissues and Blood Using the Immersion Method. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **38**, 2497-2518. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/15/001>
- [13] Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Kolesnikova, E.A., Basko, M.V., Terentyuk, G.S. and Tuchin, V.V. (2013) Optical Coherence Tomography Monitoring of Enhanced Skin Optical Clearing in Rats *in Vivo*. *Journal of Biomedical Optics*, **19**, Article ID: 021109. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.2.021109>
- [14] Wen, X., Mao, Z., Han, Z., Tuchin, V.V. and Zhu, D. (2009) *In Vivo* Skin Optical Clearing by Glycerol Solutions: Mechanism. *Journal of Biophotonics*, **3**, 44-52. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910080>
- [15] Shi, R., Feng, W., Zhang, C., Zhang, Z. and Zhu, D. (2017) Fsoca-induced Switchable Footpad Skin Optical Clearing Window for Blood Flow and Cell Imaging *in Vivo*. *Journal of Biophotonics*, **10**, 1647-1656.

- <https://doi.org/10.1002/jbio.201700052>
- [16] Jiang, J. and Wang, R.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. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/49/23/006>
- [17] Zhao, Q., Dai, C., Fan, S., Lv, J. and Nie, L. (2016) Synergistic Efficacy of Salicylic Acid with a Penetration Enhancer on Human Skin Monitored by OCT and Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 34954. <https://doi.org/10.1038/srep34954>
- [18] Nguyen, H.X. and Banga, A.K. (2018) Electrically and Ultrasonically Enhanced Transdermal Delivery of Methotrexate. *Pharmaceutics*, **10**, Article 117. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030117>
- [19] Liu, K., Green, C.R., Alany, R.G. and Rupenthal, I.D. (2013) Synergistic Effect of Chemical Penetration Enhancer and Iontophoresis on Transappendageal Transport of Oligodeoxynucleotides. *International Journal of Pharmaceutics*, **441**, 687-692. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.027>
- [20] Park, J., Lee, H., Lim, G., Kim, N., Kim, D. and Kim, Y. (2019) Enhanced Transdermal Drug Delivery by Sonophoresis and Simultaneous Application of Sonophoresis and Iontophoresis. *AAPS PharmSciTech*, **20**, Article No. 96. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1309-z>
- [21] Zhao, J., Wu, Y., Chen, J., Lu, B., Xiong, H., Tang, Z., et al. (2018) *In Vivo* Monitoring of Microneedle-Based Transdermal Drug Delivery of Insulin. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, **11**, Article ID: 1850032. <https://doi.org/10.1142/s1793545818500323>
- [22] Wong, T.W. (2014) Electrical, Magnetic, Photomechanical and Cavitation Waves to Overcome Skin Barrier for Transdermal Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, **193**, 257-269. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.045>
- [23] Fu, X., Wang, Z., Wang, H., Wang, Y.T., Jenkins, M.W. and Rollins, A.M. (2014) Fiber-Optic Catheter-Based Polarization-Sensitive OCT for Radio-Frequency Ablation Monitoring. *Optics Letters*, **39**, 5066-5069. <https://doi.org/10.1364/ol.39.005066>
- [24] Xu, X.Q. and Zhu, Q.H. (2008) Feasibility of Sonophoretic Delivery for Effective Skin Optical Clearing. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **55**, 1432-1437. <https://doi.org/10.1109/tbme.2007.912416>
- [25] Novoselova, M.V., Abakumova, T.O., Khlebtsov, B.N., Zatsepin, T.S., Lazareva, E.N., Tuchin, V.V., et al. (2020) Optical Clearing for Photoacoustic Lympho- And Angiography Beyond Conventional Depth Limit *in Vivo*. *Photoacoustics*, **20**, Article ID: 100186. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2020.100186>
- [26] Zhang, D., Chen, B., Mu, Q., Wang, W., Liang, K., Wang, L., et al. (2021) Topical Delivery of Gambogic Acid Assisted by the Combination of Low-Frequency Ultrasound and Chemical Enhancers for Chemotherapy of Cutaneous Melanoma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **166**, Article ID: 105975. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105975>
- [27] Polat, B.E., Hart, D., Langer, R. and Blankschtein, D. (2011) Ultrasound-mediated Transdermal Drug Delivery: Mechanisms, Scope, and Emerging Trends. *Journal of Controlled Release*, **152**, 330-348. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.006>
- [28] Alvarez-Román, R., Merino, G., Kalia, Y.N., Naik, A. and Guy, R.H. (2003) Skin Permeability Enhancement by Low Frequency Sonophoresis: Lipid Extraction and Transport Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **92**, 1138-1146. <https://doi.org/10.1002/jps.10370>
- [29] Liu, H., Abbasi, M., Ding, Y.H., Polley, E.C., Fitzgerald, S., Kadirkvel, R., et al. (2020) Characterizing Thrombus with Multiple Red Blood Cell Compositions by Optical Coherence Tomography Attenuation Coefficient. *Journal of Biophotonics*, **14**, e202000364. <https://doi.org/10.1002/jbio.202000364>
- [30] Merino, G., Kalia, Y.N., Delgado-Charro, M.B., Potts, R.O. and Guy, R.H. (2003) Frequency and Thermal Effects on the Enhancement of Transdermal Transport by Sonophoresis. *Journal of Controlled Release*, **88**, 85-94. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00464-9](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00464-9)
- [31] Clennell, B., Steward, T.G.J., Elley, M., Shin, E., Weston, M., Drinkwater, B.W., et al. (2021) Transient Ultrasound Stimulation Has Lasting Effects on Neuronal Excitability. *Brain Stimulation*, **14**, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2021.01.003>
- [32] Shamaprasad, P., Frame, C.O., Moore, T.C., Yang, A., Iacobella, C.R., Bouwstra, J.A., et al. (2022) Using Molecular Simulation to Understand the Skin Barrier. *Progress in Lipid Research*, **88**, Article ID: 101184. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101184>.