

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ – ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΦΥΣΙΚΗ - ΑΚΤΙΝΟΦΥΣΙΚΗ»**

Τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τμήμα Φυσικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τμήμα Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Τμήμα Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης

**Μοντελοποίηση της Διάχυσης Διαδερμικών Συστημάτων
με τη Μέθοδο των Πεπερασμένων Στοιχείων**

**Diffusion Modeling of Transdermal Systems
with the Finite Element Method**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σαμαράς Δημήτριος

Επιβλέπων : Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής -
Βιοφυσικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής - Βιοφυσικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων).

Εμφιετζόγλου Δημήτριος, Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής - Ακτινοφυσικής, Τμήμα Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Αστρακάς Λουκάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Κατάλογος Εικόνων	7
Κατάλογος Διαγραμμάτων	9
Κατάλογος Πινάκων	11
Αφιέρωση	12
Ευχαριστίες	13
Περίληψη	14
Abstract	16

Κεφάλαιο 1: Ανατομία και Εμβιομηχανική του Δέρματος

1.1. Ανατομία και Φυσιολογία του δέρματος	18
1.1.1. Εισαγωγή	18
1.1.2. Δομή του Δέρματος	19
1.1.2.1. <i>Επιδερμίδα (Epidermis)</i>	20
1.1.2.1.1. <i>Κεράτινη Στιβάδα (Stratum Corneum)</i>	22
1.1.2.1.2. <i>Βιώσιμη ή Ζώσα Επιδερμίδα (Viable Epidermis)</i>	23
1.1.2.2. <i>Κυρίως Δέρμα ή Χόριο (Dermis)</i>	25
1.1.2.3. <i>Υποδόριος Ιστός</i>	27
1.2. Διαδερμική Διαπερατότητα	27
1.2.1. Εισαγωγή	27
1.2.2. Μηχανισμός Παθητικής Διάχυσης	30
1.2.3. Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Διαδερμική Απορρόφηση	31
1.3. Κινητική της Διαδερμικής Απορρόφησης	32
1.3.1. Θεωρία της Διάχυσης	32
1.3.2. Νόμοι της Διάχυσης	33
1.3.3. Παράγοντες Καθορισμού της Διαδερμικής Διάχυσης	38

1.3.4. Τοπικές Φαρμακοτεχνικές Μορφές	39
1.4 Ενισχυτές Διαπερατότητας	40
1.4.1. Γενικά	40
1.4.2. Παράγοντες Οπτικού Καθαρισμού (Optical Clearing Agents – OCAs)	41
1.4.2.1. Ελαϊκό Οξύ (<i>Oleic Acid - OA</i>)	45
1.4.2.2. Προπυλενογλυκόλη (<i>Propylene Glycol – PG</i>)	46
Κεφάλαιο 2 : Επισκόπηση των Μεθόδων Καθαρισμού Ιστών	48
2.1. Η Τεχνική	48
2.2. Ιστορική Αναδρομή Οπτικού Καθαρισμού Ιστών	51
2.3. Φυσικές Μέθοδοι	53
2.3.1 Οργανικοί Παράγοντες	54
2.3.2. Υδατικοί Παράγοντες	56
2.4. Χημικές Μέθοδοι	58
2.4.1 Μετασχηματισμός Ιστού	58
2.5. Εφαρμογές Μεθόδων Οπτικού Καθαρισμού	59
2.6. Καθαρισμός Ιστού <i>In Vivo</i>	62
Κεφάλαιο 3 : Μεθοδολογικό και Τεχνολογικό Υπόβαθρο	71
3.1. Πρόγραμμα Προσομοίωσης CAD	71
3.2. Μέθοδος Πεπερασμένων Στοιχείων (Finite Element Method)	73
3.2.1. Ανάλυση Πεπερασμένων Στοιχείων (Finite Element Analysis)	73
3.2.2. Βασικές Αρχές του FEA	74
3.2.3. Εφαρμογές FEA	75
3.3. Το Λογισμικό <i>FEBioStudio</i>	76
3.3.1. Περιγραφή του Λογισμικού <i>FEBioStudio</i>	77
3.3.2. Γραφικό Περιβάλλον Δημιουργίας Μοντέλου	79

3.3.3. Μεταγλώττιση μέσω της Εφαρμογής Γραμμής Εντολών	81
3.3.4. Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων (Post-Processor)	81
 <i>Κεφάλαιο 4 : Εφαρμογή</i>	
4.1. Σκοπός της παρούσας μελέτης	84
4.2. Μοντελοποίηση της Διάχυσης Διαδερμικών Συστημάτων με τη Μέθοδο των Πεπερασμένων Στοιχείων	85
4.2.1. Υλικά και Μέθοδοι	85
4.2.1.1. Ιδιότητες του Δέρματος και των Στρωμάτων	86
4.2.1.2. Τα <i>Index Matching Gels</i> που Χρησιμοποιήθηκαν	88
4.2.2. Δημιουργία του μοντέλου	90
4.2.2.1. Κατασκευή Γεωμετρίας	90
4.2.2.1.1. Παραδοχές που θεωρήθηκαν	91
4.2.2.1.2. Συνοριακές Συνθήκες	94
 <i>Κεφάλαιο 5 : Αποτελέσματα της Μελέτης</i>	
5.1. Συγκέντρωση του <i>Index Matching Gel</i> σε Συνάρτηση με τον Χρόνο	98
5.1.1. Μελέτη Μεταβολής της Συγκέντρωσης σε Συνάρτηση με το Χρόνο	98
<i>Άνω σημείο Κεράτινης Στιβάδας – Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας</i>	98
<i>Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας – Ενδιάμεσο Σημείο</i>	
<i>Βιώσιμης Επιδερμίδας</i>	99
5.1.2. Μελέτη Μεταβολής της Συνολικής Ροής σε Συνάρτηση με τον Χρόνο	101
<i>Άνω σημείο Κεράτινης Στιβάδας – Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας</i>	101
<i>Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας – Ενδιάμεσο Σημείο</i>	
<i>Βιώσιμης Επιδερμίδας</i>	104
5.1.3. Μελέτη Μεταβολής της Συγκέντρωσης σε Συνάρτηση με τη Θέση στον Άξονα Z	107

<i>Κεράτινη Στιβάδα – Βιώσιμη Επιδερμίδα</i>	107
<i>Συγκέντρωση ανά Ζεύγη : Κεράτινη Στιβάδα – Βιώσιμη Επιδερμίδα</i>	109
<i>Σχέση Συγκέντρωσης PG/OA κατά τον Κατακόρυφο Άξονα Z</i>	110
5.1.4. Μελέτη Μεταβολής της Ροής σε Συνάρτηση με τη Θέση στον Άξονα Z	111
<i>Κεράτινη Στιβάδα – Βιώσιμη Επιδερμίδα</i>	111
<i>Ροή ανά Ζεύγη : Κεράτινη Στιβάδα – Βιώσιμη Επιδερμίδα</i>	113
<i>Σχέση Ροής OA/PG κατά τον Κατακόρυφο Άξονα Z</i>	114
5.1.5. Στιγμιότυπα της Συγκέντρωσης με το Χρόνο	115
Συζήτηση & Συμπεράσματα	
Συζήτηση	118
Συμπεράσματα	123
Βιβλιογραφία	124
Παράρτημα – Ορολογία	137

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1	Στιβάδες του Δέρματος	20
Εικόνα 2	Στιβάδες της Επιδερμίδας	21
Εικόνα 3	Brick and Mortar Model	22
Εικόνα 4	Θηλώδης και Δικτυωτή Περιοχή του Χόριου	26
Εικόνα 5	Υποδόριος Ιστός	27
Εικόνα 6	Στάδια Διαδερμικής Απορρόφησης	29
Εικόνα 7	Μηχανισμοί Παθητικής Διάχυσης	30
Εικόνα 8	Παθητική Μεταφορά Μάζας	33
Εικόνα 9	Ροή Μάζας M	35
Εικόνα 10	2ος νόμος Fick - Η Ροή Διαφέρει από το Ένα Σημείο στο Άλλο	37
Εικόνα 11	Πλέγμα Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων που Καθορίζουν το Βαθμό Διάχυσης του Φαρμακομορίου	39
Εικόνα 12	Χημικές Δομές Τυπικών Χημικών Ενισχυτών Διαπερατότητας	41
Εικόνα 13	Είδη Οπτικού Καθαρισμού	49
Εικόνα 14	Εφαρμογές Οπτικού Καθαρισμού	50
Εικόνα 15	Εγκέφαλοι Ποντικίου Πριν και Μετά τον Καθαρισμό	61
Εικόνα 16	Διαδερμική Απεικόνιση της Κυκλοφορίας του Αίματος Μέσω Οπτικά Καθαρού Δέρματος με Χρήση Λέιζερ Απεικόνισης Κηλίδων Αντίθεσης	65
Εικόνα 17	Παραδείγματα FEA	75
Εικόνα 18	Τα κύρια στοιχεία του περιβάλλοντος GUI	80
Εικόνα 19	Το Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων με Φορτωμένο Αρχείο – Αρχικό	82

Εικόνα 20 Το Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων με Φορτωμένο Αρχείο – Τελικό	83
Εικόνα 21 Χημική δομή: (A) Ελαϊκό Οξύ - (B) Προπυλενογλυκόλη	89
Εικόνα 22 Περιγραφή του Συντελεστή Poisson	93
Εικόνα 23 Αναπαράσταση του Τελικού Ολοκληρωμένου Μοντέλου	96
Εικόνα 24 Αναπαράσταση Σταθεροποίησης της Συγκέντρωσης της Προπυλενογλυκόλης [t =400 timesteps]	115
Εικόνα 25 Αναπαράσταση της Συγκέντρωσης του Ελαϊκού οξέος [t =400 timesteps]	116
Εικόνα 26 Αναπαράσταση της Συγκέντρωσης του Ελαϊκού Οξέος [t=700 timesteps]	116
Εικόνα 27 Αναπαράσταση της Συγκέντρωσης της Προπυλενογλυκόλης [t =700 timesteps]	117

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1	Απεικόνιση της Παθητικής Διάχυσης	34
Διάγραμμα 2	Απαιτούμενη Χρόνος για Επίτευξη Σταθεροποιημένης Κατάστασης (Χρόνος Υστέρησης, t_L)	38
Διάγραμμα	Γράφημα Δημοσιευμένων Εργασιών για Καθαρισμό Ιστών κατά τον Πέρασμένο Αιώνα	52
Διάγραμμα 4	[Επάνω] Μέθοδοι καθαρισμού με Εστίαση Βιολογικές Εφαρμογές	60
Διάγραμμα 5	[Κάτω] Χρονοδιάγραμμα Χρήσης Τεχνικών Καθαρισμού για Βιολογικές Εφαρμογές	60
Διάγραμμα 6	Διάγραμμα Περιγραφής του Συντελεστή Young	92
Διάγραμμα 7	Συγκέντρωση Ελαϊκού Οξέος – Χρόνος [Άνω Σημεία]	98
Διάγραμμα 8	Συγκέντρωση Προπυλενογλυκόλης – Χρόνος [Άνω Σημεία]	98
Διάγραμμα 9	Συγκέντρωση Ελαϊκού Οξέος – Χρόνος [Ενδιάμεσα Σημεία]	100
Διάγραμμα 10	Συγκέντρωση Προπυλενογλυκόλης – Χρόνος [Ενδιάμεσα Σημεία]	100
Διάγραμμα 11	Συνολική Ροή Ελαϊκού Οξέος -Χρόνος [Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]	102
Διάγραμμα 12	Συνολική Ροή Ελαϊκού Οξέος -Χρόνος [Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας]	102
Διάγραμμα 13	Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος [Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]	103
Διάγραμμα 14	Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος [Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας]	103

Διάγραμμα 15	Συνολική Ροή Ελαϊκού -Χρόνος	
	[Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]	104
Διάγραμμα 16	Συνολική Ροή Ελαϊκού -Χρόνος	
	[Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας]	105
Διάγραμμα 17	Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος	
	[Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]	106
Διάγραμμα 18	Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος	
	[Ενδιάμεσο Σημείο βιώσιμης Επιδερμίδας]	106
Διάγραμμα 19	Συγκέντρωση Ελαϊκού Οξέος – Θέση στον Άξονα Z	107
Διάγραμμα 20	Συγκέντρωση Προπυλενογλυκόλης - Θέση στον Άξονα Z	108
Διάγραμμα 21	Συνολική Ροή Ελαϊκού Οξέος - Θέση στον Άξονα Z	112
Διάγραμμα 22	Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης - Θέση στον Άξονα Z	112

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1	Δομή και Φυσικά - Χημικά Χαρακτηριστικά του Ελαϊκού οξέος	46
Πίνακας 2	Δομή και Φυσικά - Χημικά Χαρακτηριστικά της Προπυνελογλυκόλης	47
Πίνακας 3	Πρακτικές και Εφαρμογές Οπτικού Καθαρισμού Ιστών	70

Αφιερώνεται
Στην Οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021- 2022, στα πλαίσια του ΔΠΜΣ «Ιατρική Φυσική-Ακτινοφυσική», υπό την επίβλεψη του κ. Νικόλαου Κουρκουμέλη, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος.

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Νικόλαο Κουρκουμέλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για τις γνώσεις που μου έχει μεταδώσει κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας, τόσο σε προπτυχιακό, όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο. Τον ευχαριστώ θερμά για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις εύστοχες υποδείξεις του, τις πολύτιμες συμβουλές του, τη συμπαράστασή του, τη συνεχή του υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος της συνεργασίας μας. Εκτιμώ βαθύτατα τη βοήθεια και την σπουδαία συμβολή του, που με βοήθησαν στην αρτιότερη και πληρέστερη παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας. Ελπίζω και εύχομαι η συνεργασία μαζί του να συνεχιστεί και στο μέλλον.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της επιτροπής κ. Δημήτρη Εμφιετζόγλου και κ. Λουκά Ασπρακά, για το χρόνο που αφιέρωσαν.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένεια μου η οποία στέκεται δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια, με συμβουλεύει και είναι εκεί σε οποιαδήποτε επιλογή μου και με στηρίζει, προκειμένου να εκπληρώσω οποιοδήποτε στόχο και όνειρο μου. Τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον πατέρα μου, που στάθηκε αρωγός και στήριγμα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής, καθώς με τις χρήσιμες συμβουλές του πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.

Το δέρμα είναι ένα περίπλοκο βιολογικό σύστημα που διαθέτει ένα πλήθος συζευγμένων φυσικών διεργασιών. Από την άποψη της εμβιομηχανικής, το δέρμα είναι κατά κύριο λόγο μια πολυφασική και πολλαπλής κλίμακας δομή η οποία, περιλαμβάνει ένα πλούσιο σύνολο μηχανικών ιδιοτήτων και αλληλεπιδράσεων. Η βιολογική φύση αυτής της δομής καθιστά αυτές τις ιδιότητες δυναμικές, και όπως οι περισσότεροι βιολογικοί ιστοί, υπάρχει έντονη μεταβλητότητα. Το δέρμα θεωρείται γενικά ως ένα συγκρότημα πολλαπλών στρωμάτων που αποτελείται από τρεις κύριες διακριτές δομές: την επιδερμίδα, το χόριο και το υπόδερμα, το καθένα με διαφορετικούς συντελεστές διάχυσης. Η επιδερμίδα, η οποία δεν έχει αγγεία, χωρίζεται στην κεράτινη στιβάδα και στη ζώσα επιδερμίδα.

Οι βιολογικοί ιστοί γενικά χαρακτηρίζονται από ισχυρή σκέδαση φωτός, η οποία αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην εφαρμογή των οπτικών μεθόδων στην κλινική πράξη, λόγω της εσωτερικής ετερογενούς σύνθεσης. Σε κάθε οπτική και μικροσκοπική τεχνική, η ικανότητα εν τω βάθει απεικόνισης σε ένα βιολογικό δείγμα εξαρτάται από το περιορισμένο βάθος διείσδυσης του φωτός μέσα στους βιολογικούς ιστούς, καθώς είναι οπτικά μέσα που χαρακτηρίζονται από υψηλή θολότητα. Ακόμα κι αν αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό εδώ και πολύ καιρό, η μελέτη των οπτικών παραγόντων καθαρισμού (Optical Clearing Agents – OCAs) και γενικότερα των εξωγενών παραγόντων, ικανών να μειώσουν τη σκέδαση στους βιολογικούς ιστούς, να ενισχύσουν την αντίθεση της εικόνας και να αυξήσουν το βάθος διείσδυσης είναι σχετικά πρόσφατη. Τα τελευταία χρόνια, τα OCAs έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό και με επιτυχία για τη μείωση της διασποράς, αποδεικνύοντας τα οφέλη τους στην βαθύτερη ικανότητα απεικόνισης, για μια μεγάλη ποικιλία οπτικών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής τομογραφίας συνοχής (Optical Coherence Tomography – OCT).

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η μοντελοποίηση της διάχυσης παραγόντων οπτικού καθαρισμού στο δέρμα και πιο συγκεκριμένα στην κεράτινη και βιώσιμη επιδερμίδα, με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων (Finite Element Method-FEM). Η μέθοδος υποδιαιρεί ένα μεγάλο πρόβλημα σε μικρότερα, απλούστερα μέρη που ονομάζονται πεπερασμένα στοιχεία και στη συνέχεια, συναρμολογεί ένα μεγαλύτερο σύστημα εξισώσεων που μοντελοποιεί ολόκληρο το πρόβλημα. Για την εκπόνηση της εργασίας χρησιμοποιήθηκε, ως πρόγραμμα εφαρμογής FEM, το λογισμικό *FEBioStudio*[®] (Finite Elements For Biomechanics), που έχει σχεδιαστεί ειδικά για εφαρμογές εμβιομηχανικής και βιοφυσικής.

Ο σκοπός της μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων οπτικού καθαρισμού, όπως του ελαϊκού οξέος (OA) και της προπυλενογλυκόλης (PG), ως ενισχυτικά της οπτικής διαπερατότητας του δέρματος, κατά τη διενέργεια μια εξέτασης OCT. Η χρήση του κατάλληλου μέσου οπτικού καθαρισμού ιστών εξασφαλίζει την εξισορρόπηση του συντελεστή διάθλασης του αέρα και των εξωκυττάρων διαμερισμάτων, διευκολύνοντας τη διάδοση του φωτός εντός του ιστού.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, αποδεικνύεται ότι το καταλληλότερο index matching gel είναι η προπυλενογλυκόλη, καθώς εισχωρεί στο δέρμα και κατανέμεται ομοιόμορφα, μειώνοντας τη σκέδαση. Επιλέγεται δηλαδή, το OCA που διαχέεται στον εξωκυττάριο χώρο, προσαρμόζοντας τον συντελεστή διάθλασης. Επίσης, η προπυλενογλυκόλη έχει το πλεονέκτημα να μην εμφανίζει τοξικότητα ή άλλες παρενέργειες.

Λέξεις κλειδιά: Δέρμα, Κεράτινη στιβάδα, SC, Βιώσιμη επιδερμίδα, VE, Index matching gel, Παράγοντες οπτικού καθαρισμού, OCAs, Μέθοδος πεπερασμένων στοιχείων, *FEBioStudio*.

Skin is a complex biological system with a set of conjugated natural processes. From a biomechanical point of view, skin is primarily a multi-phase and multi-scale structure that includes a rich set of mechanical properties and interactions. The biological nature of this structure makes it dynamic, and like most biological tissues, with intense variability. Skin is generally considered to be a multi-layered complex system consisting of three main distinct structures: the epidermis, the dermis and the subcutaneous tissue, each with different diffusion coefficients. The epidermis, which has no vessels, is divided into the stratum corneum and the living skin.

Biological tissues are generally characterized by strong light scattering, which is a significant obstacle to the application of optical methods in clinical practice, due to the internal heterogeneous composition. In any optical and microscopic technique, the image of a biological sample depends on the limited depth of light penetration within the biological tissues, which is characterized by high opacity. Even though this phenomenon has been known for a long time, the study of Optical Clearing Agents (OCAs), which are able to reduce scattering in biological tissues, enhance image contrast, and increase the penetration depth, is relatively recent. In recent years, OCAs have been used extensively to reduce scattering, demonstrating their results in providing deeper imaging capabilities for a wide variety of optical techniques, including Optical Coherence Tomography (OCT).

In this thesis, the modeling of the diffusion of optical clearing agents on the skin and more specifically on the stratum corneum and viable epidermis, is studied, using the finite element method (Finite Element Method-FEM). The method divides a large entity into smaller, simpler parts called finite elements, and then assembles an extensive array of equations that models the whole system. For the

implementation of the thesis was carried out using the software FEBioStudio® (Finite Elements for Biomechanics), which is specifically designed for biomechanics and biophysical applications.

The aim of this study was to examine the effect of two optical clearing agents, oleic acid (OA) and propylene glycol (PG), as enhancers of skin optical permeability, during an OCT examination. The use of the appropriate optical clearing agent, ensures the balance of the refractive index between the air and the extracellular matrix, facilitating the reduced scattering of optical rays into the tissue.

Based on the results of the study, it turns out that the most suitable index matching gel is propylene glycol, as it penetrates the skin and is evenly distributed, reducing scattering. In other words, the OCA that diffuses into the extracellular space is selected, adjusting the refractive index. Also, propylene glycol has the advantage of being free of toxic or other side effects.

Keywords: Skin, Stratum corneum, SC, Viable Epidermis, VE, Index matching gel, Optical clearing agents, OCAs, Finite element method, FEBioStudio.

Ανατομία και Εμβιομηχανική του Δέρματος

1.1. Ανατομία και Φυσιολογία του δέρματος

1.1.1. Εισαγωγή

Το ανθρώπινο δέρμα είναι το εξωτερικό κάλυμμα και το μεγαλύτερο όργανο του σώματος. Αποτελεί δε, προστατευτικό εμπόδιο, αφήνοντας τους περισσότερους ανεπιθύμητους παράγοντες έξω από το σώμα, ενώ ταυτόχρονα αφήνει τις επιθυμητές ουσίες να διεισδύσουν στο εσωτερικό [2], λειτουργώντας ως απαραίτητη φυσική διεπαφή. Αυτή η διεπαφή ελέγχει πολλούς τύπους ανταλλαγών μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού μας κόσμου που λαμβάνουν τη μορφή μηχανικών, θερμικών, βιολογικών, χημικών και ηλεκτρομαγνητικών διεργασιών. Αυτές οι διεργασίες συνήθως δεν λειτουργούν μεμονωμένα, αλλά είναι μέρη ενός πολύ δυναμικού συστήματος που διαθέτει πολύπλοκους μη γραμμικούς μηχανισμούς δράσης - ανάδρασης [3].

Στους ανθρώπους, το δέρμα - το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως μεμβράνη - αντιπροσωπεύει έως και το 16% του συνολικού σωματικού βάρους ενός ενήλικα [3] και έχει επιφάνεια 1.5–2.0 m². Το πάχος του δέρματος ποικίλλει σημαντικά σε όλα τα μέρη του σώματος, μεταξύ ανδρών και γυναικών, καθώς επίσης μεταξύ νέων και ηλικιωμένων. Εξ αιτίας της αυξημένης παραγωγής των ανδρογόνων (ορμόνες του ανδρικού φύλου, όπως η τεστοστερόνη) το ανδρικό δέρμα είναι κατά 25% πιο παχύ από το γυναικείο. Επιπλέον, με το πέρασμα του χρόνου σταδιακά λεπταίνει, ενώ το πάχος του γυναικείου δέρματος παραμένει σταθερό

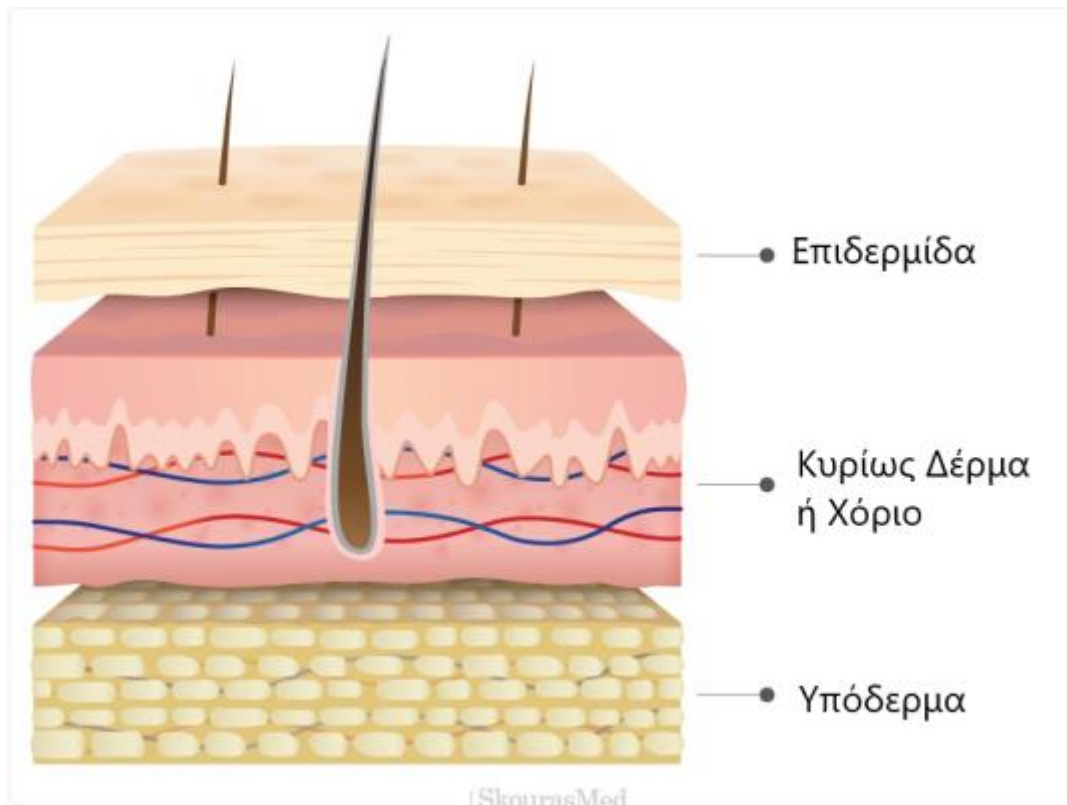
μέχρι την κλιμακτήριο. Ανεξάρτητα από την ηλικία, εξάλλου, οι άντρες έχουν υψηλότερη πυκνότητα κολλαγόνου απ' ό,τι οι γυναίκες, γι' αυτό και το δέρμα τους μοιάζει να γερνάει με πιο αργό ρυθμό. Σχετικά με την υφή του δέρματος, το ανδρικό δέρμα είναι πιο τραχύ και η εξωτερική στιβάδα της επιδερμίδας, η κεράτινη, είναι πιο παχιά.

Το δέρμα είναι επίσης, ένα βιοχημικό «εργοστάσιο», αλληλεπιδρά με το περιβάλλον και συνθέτει ζωτικές ενώσεις όπως η βιταμίνη D, φιλοξενεί ζωτικές ανοσολογικές βιοχημικές και κυτταρικές διεργασίες και περιέχει ένα πλούσιο αισθητηριακό βιοφυσικό δίκτυο που μας ενημερώνει σε πραγματικό χρόνο για τυχόν απτικές ενδείξεις ή δυνητικά απειλητικές σωματικές προσβολές και επιβλαβείς παράγοντες. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του δέρματος στη ζωή μας και τις πολλαπλές φυσιολογικές του λειτουργίες, από τη γέννηση μέχρι το θάνατο, η κατανόηση της περίπλοκης φυσιολογίας και βιοφυσικής του έχει γίνει, ιδιαίτερα τις δύο τελευταίες δεκαετίες, ένας ευρύς ερευνητικός χώρος. Ένα από τα πολλά υποσχόμενα επιτεύγματα, είναι και ο οπτικός καθαρισμός του δέρματος και γενικότερα των ιστών, υποβοηθά σε πολλές διαδικασίες ιατρικής διάγνωσης.

1.1.2. Δομή του Δέρματος

Ως προς την κατασκευή, το δέρμα αποτελείται από τα εξής στρώματα-στιβάδες (Εικόνα 1):

- Επιδερμίδα (Epidermis)
- Κυρίως δέρμα ή χόριο (Dermis)
- Υπόδερμα ή υποδόριος ιστός (Hypodermis or Subcutaneous Tissue)



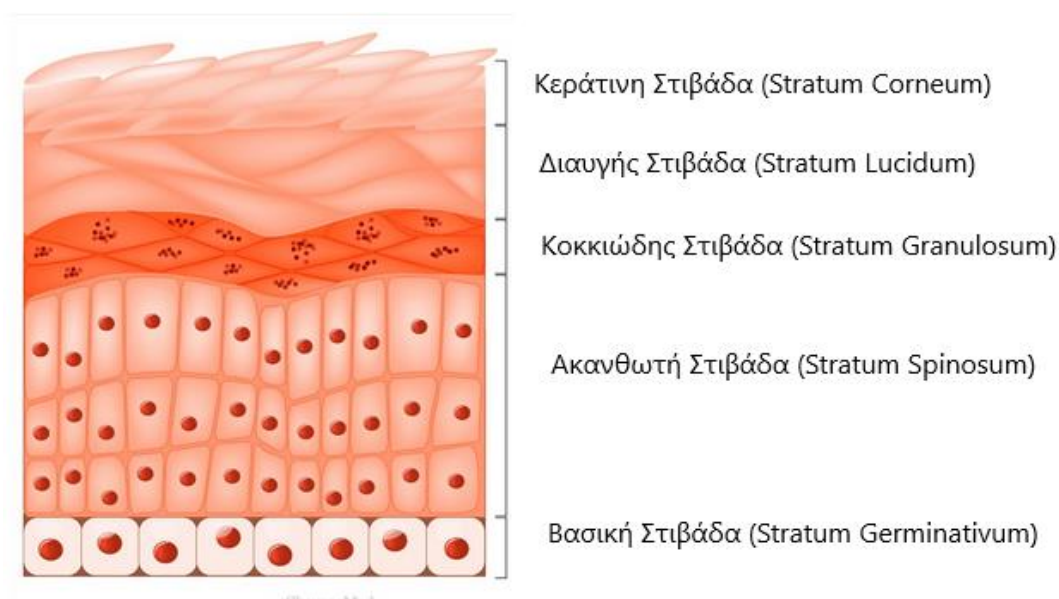
Εικόνα 1: Στιβάδες του Δέρματος

1.1.2.1. Επιδερμίδα (Epidermis)

Η επιδερμίδα είναι το πιο εξωτερικό στρώμα του δέρματος. Σχηματίζει το αδιάβροχο, προστατευτικό κάλυμμα στην επιφάνεια του σώματος, το οποίο χρησιμεύει επίσης, ως φραγμός σε μολύνσεις και αποτελείται από στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο. Η επιδερμίδα δεν διαθέτει αγγεία και τα κύτταρα στα βαθύτερα στρώματα τρέφονται σχεδόν αποκλειστικά από το διάχυτο οξυγόνο από τον περιβάλλοντα αέρα και σε πολύ μικρότερο βαθμό από τα τριχοειδή αγγεία του αίματος που εκτείνονται στα εξωτερικά στρώματα του χορίου. Επιπλέον, η επιδερμίδα υποβάλλεται σε ένα τακτικό μοτίβο πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κερατινοποίησης. Αποτελείται έτσι, από ένα κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο δεν συνδέεται οριζοντίως με το χόριο, αλλά σχηματίζει προεκβολές προς αυτό, σχηματίζοντας το εξωτερικό στρώμα του δέρματος [1].

Οι τύποι των κυττάρων που συνθέτουν την επιδερμίδα είναι τα κερατινοκύτταρα ή αλλιώς επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και τα μη κερατινοποιημένα κύτταρα, όπως τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα Langerhans και τα κύτταρα του Merkel τα οποία δε συμμετέχουν στη διαδικασία της κερατινοποίησης.

Η επιδερμίδα χωρίζεται σε δύο κύρια στρώματα: την *κεράτινη στιβάδα* και τη *βιώσιμη ή ζώσα επιδερμίδα*. Η *βιώσιμη επιδερμίδα* μπορεί περαιτέρω να υποδιαιρεθεί στις ακόλουθες στιβάδες (ξεκινώντας από το εξώτατο στρώμα): *κοκκιώδης, ακανθώδης και βασική στιβάδα*, ενώ στα πέλματα και στις παλάμες, μεταξύ της κεράτινης και της κοκκιώδους στιβάδας, υπάρχει και η *διαυγής στιβάδα*. Τα κύτταρα σχηματίζονται, μέσω της μίτωσης, στο βασικό στρώμα. Τα θυγατρικά κύτταρα κινούνται προς τα πάνω στα στρώματα, αλλάζοντας σχήμα και σύνθεση, καθώς πεθαίνουν, λόγω απομόνωσης από την πηγή αίματος τους. Το κυτταρόπλασμα απελευθερώνεται και εισάγεται η πρωτεΐνη κερατίνη. Τελικά, φτάνουν στο κερατοειδή χιτώνα και ξεφλουδίζουν (απολέπιση). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται "κερατινοποίηση".



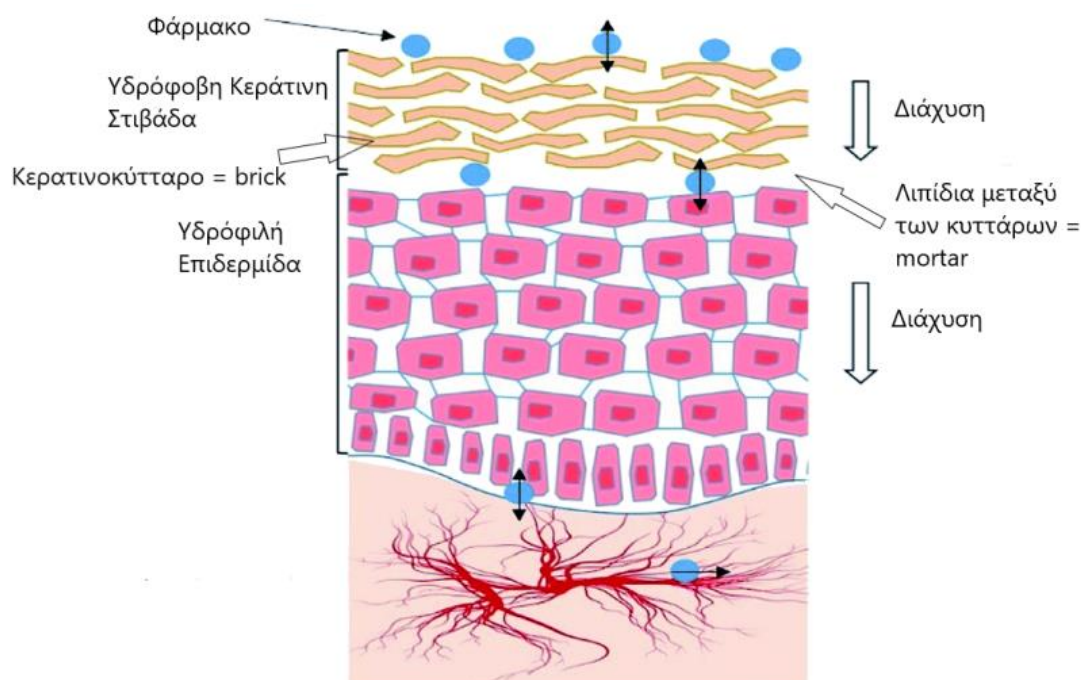
Εικόνα 2: Στιβάδες της Επιδερμίδας

Αυτό το κερατινοποιημένο στρώμα του δέρματος είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση του νερού στο σώμα και την απομάκρυνση επιβλαβών χημικών και παθογόνων παραγόντων, καθιστώντας το δέρμα φυσικό φραγμό στη μόλυνση. Επιπλέον, η επιδερμίδα βοηθά το δέρμα να ρυθμίσει τη θερμοκρασία του

σώματος. Η επιδερμίδα, λοιπόν, συνιστά το εξωτερικό, επιθηλιακό στρώμα και το χόριο το εσωτερικό στρώμα, ενώ κάτω από το χόριο βρίσκεται το υπόδερμα το οποίο περιέχει άφθονο λίπος (Εικόνα 2).

1.1.2.1.1. Κεράτινη Στιβάδα (*Stratum Corneum*)

Η κεράτινη στιβάδα αποτελεί το πιο εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας για το σώμα, διαδραματίζοντας ουσιαστικό ρόλο ως προστατευτικός φραγμός του δέρματος έναντι του εξωτερικού περιβάλλοντος. Η κεράτινη στιβάδα βοηθά στην ενυδάτωση και την κατακράτηση νερού, η οποία αποτρέπει το σκάσιμο του δέρματος. Αποτελείται από κερατινοκύτταρα, με πυρήνες που έχουν φτάσει στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης τους. Στα νεκρά, κερατινοποιημένα, απύρρηνα, σχεδόν αδιαπέραστα κύτταρα, το κυτταρόπλασμά τους έχει αντικατασταθεί από πρωτεΐνες όπως η κερατίνη, η φιλαγκρίνη και η ινβολουκρίνη. Τα κερατινοκύτταρα διατηρούν νημάτια κερατίνης μέσα σε μια μήτρα φιλαγκρίνης και το κερατινοποιημένο λιπιδικό περίβλημα αντικαθιστά την πλασματική μεμβράνη των κερατινοκυττάρων.



Εικόνα 3: Brick and Mortar Model

Αυτά τα επίπεδα κύτταρα οργανώνονται σε σχηματισμό τούβλων (τα κερατινοκύτταρα) και κονιάματος (τα μεσοκυττάρια λιπίδια), μέσα σε μια πλούσια σε λιπίδια και συνεχή εξωκυτταρική μήτρα και είναι γνωστό ως *brick and mortar model* (Εικόνα 3).

Η κεράτινη στιβάδα είναι το πιο εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας και σηματοδοτεί το τελικό στάδιο ωρίμανσης και ανάπτυξης των κερατινοκυττάρων. Τα κερατινοκύτταρα στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας, είναι πολλαπλασιαστικά και καθώς τα κύτταρα ωριμάζουν την επιδερμίδα, χάνουν αργά το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και υφίστανται προγραμματισμένη καταστροφή [10].

Σε ένα διάστημα 28 ημερών, τα κύτταρα που προέρχονται από τη βασική στιβάδα μεταναστεύουν στην επιφάνεια του δέρματος, υποβάλλονται σε διάφορες διαδικασίες διαφοροποίησης και συμμετέχουν στη διαδικασία της κερατινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα χάνουν τους πυρήνες τους, γίνονται επίπεδα, απορρίπτουν λιπίδια στο μεσοκυττάριο χώρο (κοκκιώδης στιβάδα), και κερατινοποιούνται, δημιουργώντας, έτσι, τη μοναδική δομή της κεράτινης στιβάδας. Επιπλέον, τα κύτταρα υιοθετούν σφιχτή διευθέτηση στο εσωτερικό της στιβάδας, ενώ όσο ανεβαίνουν προς την επιφάνεια χαλαρώνουν μέχρι να απομακρυνθούν πλήρως. Τέλος, πεθαίνουν, όταν φτάσουν στο ανώτερο επίπεδο της επιδερμίδας (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) [1].

1.1.2.1.2. Βιώσιμη ή Ζώσα Επιδερμίδα (*Viable Epidermis*)

Η βιώσιμη επιδερμίδα είναι το στρώμα του δέρματος που βρίσκεται κάτω από την κεράτινη στιβάδα. Είναι στρωματοποιημένο, πλακώδες και κερατινοποιημένο επιθήλιο και είναι υπεύθυνο για τις ιδιότητες φραγμού του δέρματος. Περιέχει μελανοκύτταρα και κύτταρα Langerhans. Αποτελείται από άλλα στρώματα στα οποία τα κύτταρα βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης. Αυτά τα στρώματα είναι τα εξής:

- **Κοκκιώδης Στιβάδα (*Stratum Granulosum*)**

Η κοκκιώδης (ή κοκκώδης) στιβάδα είναι ένα λεπτό στρώμα κυττάρων στην επιδερμίδα, που βρίσκεται πάνω από την ακανθώδη στιβάδα και κάτω από την κεράτινη στιβάδα. Στην κοκκιώδη στιβάδα ξεκινά η κερατινοποίηση των κερατινοκυττάρων. Καθώς τα κύτταρα κινούνται προς τα πάνω σε αυτό το στρώμα, αρχίζουν να χάνουν τους πυρήνες και τα κυτταροπλασματικά οργανίδια τους και μετατρέπονται σε κερατινοποιημένα πλακίδια του επόμενου στρώματος. Κατά τη μετάβαση μεταξύ αυτού του στρώματος και της κεράτινης στιβάδας, τα κύτταρα εκκρίνουν φυλλώδη σώματα, που περιέχουν λιπίδια και πρωτεΐνες, στον εξωκυτταρικό χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του υδρόφοβου λιπιδικού περιβλήματος που είναι υπεύθυνο για τις ιδιότητες φραγμού του δέρματος. Επιπλέον, στην κοκκιώδη στιβάδα εμπεριέχονται τα σωμάτια του Odland. Τα σωμάτια του Odland ή αλλιώς κερατινοσώματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων όπως κεραμίδια, χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, ελεύθερα λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια τα οποία αποβάλλονται στο μεσοκυττάριο χώρο, συμβάλλοντας, έτσι, στη λειτουργία του φραγμού της κεράτινης στιβάδας. [11]

- **Ακανθώδης Στιβάδα (*Stratum Spinosum*)**

Η ακανθώδης στιβάδα αποτελείται από 2-8 σειρές κερατινοκυττάρων και είναι ένα στρώμα της επιδερμίδας που βρίσκεται μεταξύ της κοκκιώδους στιβάδας και της βασικής στιβάδας. Τα κερατινοκύτταρα σε αυτά τα στρώματα έχουν πολλά δεσμοσώματα, τα οποία συνδέουν τα κύτταρα μεταξύ τους και περιέχουν συσσωματώματα από ενδιάμεσα νήματα (κερατίνη). Η ακανθώδης εμφάνισή τους οφείλεται στη συρρίκνωση των μικρονημάτων μεταξύ των δεσμοσωμάτων. Η κερατινοποίηση ξεκινά στην ακανθώδη στιβάδα, αν και τα πραγματικά κερατινοκύτταρα ξεκινούν από τη βασική στιβάδα. Η ακανθώδης στιβάδα περιέχει επίσης κύτταρα Langerhans, τα οποία είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν επίσης απολήξεις με τις οποίες διακλαδίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος τους είναι να δεσμεύουν αντιγόνα και να συμμετέχουν ενεργά στην ανοσολογική λειτουργία.

- **Βασική στιβάδα (*stratum germinativum*)**

Η βασική κυτταρική στιβάδα (*stratum basale*, ή *stratum germinosum*) είναι η βαθύτερη στιβάδα της επιδερμίδας και αποτελείται από ένα ενιαίο στρώμα κυττάρων και είναι το στρώμα που βρίσκεται πιο κοντά στο χόριο. Συνήθως, μόνο σε αυτό το στρώμα διαιρούνται τα κύτταρα. Στην πραγματικότητα, όλα τα συστατικά της κεράτινης στιβάδας προέρχονται από την βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Τα κερατινοκύτταρα εκκινούν από τη βασική στιβάδα, στην οποία υφίστανται μιτώσεις, οδηγούνται σταδιακά από την ακανθωτή στην κοκκιώδη στιβάδα, καταλήγοντας στην κεράτινη στιβάδα απ' όπου πέφτουν σαν κεράτινα πετάλια. Άλλοι τύποι κυττάρων που βρίσκονται στη βασική στιβάδα είναι τα μελανοκύτταρα (κύτταρα που παράγουν τη χρωστική ουσία μελανίνη, που μας προστατεύει από τις υπεριώδεις ακτίνες του ηλίου) και τα κύτταρα Merkel (υποδοχείς αφής), μέσω των οποίων γίνονται αντιληπτά τα ερεθίσματα του δέρματος, καθώς συνδέονται με τις νευρικές απολήξεις.

- **Διαυγής Στιβάδα (*stratum lucidum*)**

Στο παχύ δέρμα εντοπίζεται μερικές φορές ένα πέμπτο στρώμα, η διαυγής στιβάδα. Η στιβάδα αυτή είναι ένα λεπτό, διαυγές στρώμα νεκρών κυττάρων του δέρματος στην επιδερμίδα που ονομάστηκε έτσι για την ημιδιαφανή εμφάνισή της. Βρίσκεται μεταξύ της κοκκιώδους και της κεράτινης στιβάδας και αποτελείται από 3-5 στρώματα νεκρών, πεπλατυσμένων κερατινοκυττάρων. Το πάχος της διαυγούς στιβάδας ελέγχεται από τον ρυθμό μίτωσης (διαίρεσης) των επιδερμικών κυττάρων.

1.1.2.2. Κυρίως Δέρμα ή Χόριο (*dermis*)

Το χόριο είναι ένα ανθεκτικό και ελαστικό στρώμα του δέρματος, πάχους 3 έως 5 mm [1], κάτω από την επιδερμίδα, που αποτελείται από συνδετικό ιστό και προστατεύει το σώμα από την καταπόνηση. Το χόριο στηρίζει την επιδερμίδα, μέσω μιας βασικής μεμβράνης και τη συνδέει με τον υποδόριο ιστό. Μεταξύ επιδερμίδας και κυρίου δέρματος υπάρχει ο δερμοεπιδερμικός σύνδεσμος, ο οποίος έχει διττό ρόλο, αφενός τη μηχανική στήριξη της επιδερμίδας, αφετέρου

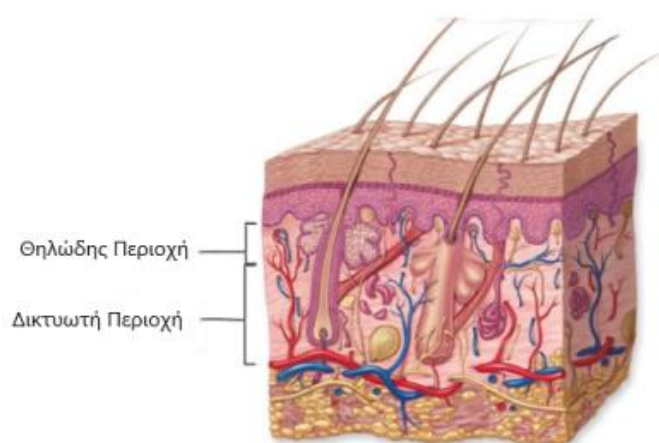
δε την επικοινωνία με αυτήν, δηλαδή την ανταλλαγή ουσιών [25]. Επίσης, φιλοξενεί πολλές νευρικές απολήξεις που παρέχουν την αίσθηση της αφής και της θερμότητας. Το χόριο διαιρείται δομικά σε δύο περιοχές:

- **Θηλώδης Περιοχή**

Η θηλώδης περιοχή αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό. Ονομάστηκε έτσι, για τις προεξοχές που μοιάζουν με δάχτυλα και ονομάζονται θηλές, οι οποίες εκτείνονται προς την επιδερμίδα. Στις παλάμες, τα δάχτυλα των χεριών, τα πέλματα και τα δάχτυλα των ποδιών, το αποτέλεσμα των θηλωμάτων που προβάλλουν, είναι να σχηματίζουν επιδερμικές ραβδώσεις που εμφανίζονται σε μοτίβα τα οποία είναι μοναδικά για το κάθε άτομο.

- **Δικτυωτή Περιοχή**

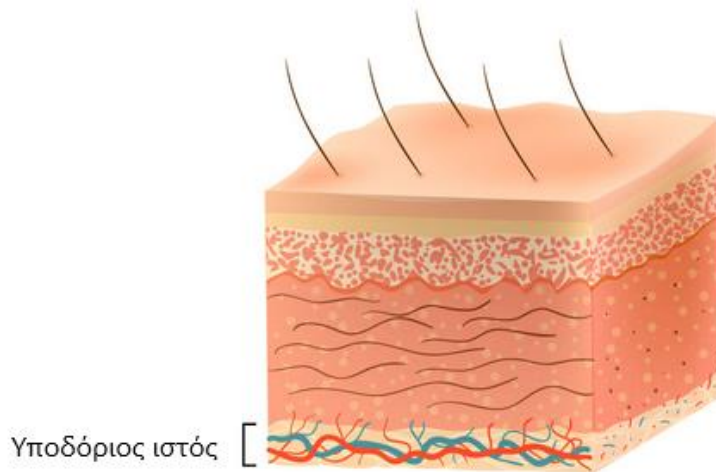
Η δικτυωτή περιοχή βρίσκεται πιο βαθιά στο χόριο, σε σχέση με τη θηλώδη περιοχή, και είναι παχύτερη. Αποτελείται από πυκνό ακανόνιστο συνδετικό ιστό και λαμβάνει το όνομά του από την πυκνή συγκέντρωση κολλαγόνων, ελαστικών και δικτυωτών ινών. Αυτές οι πρωτεϊνικές ίνες δίνουν στο χόριο τις ιδιότητες αντοχής, εκτασιμότητας και ελαστικότητας. Επίσης, εντός της δικτυωτής περιοχής, βρίσκονται οι θύλακες των τριχών, οι σμηγματογόνοι αδένες, οι ιδρωτοποιοί αδένες, τα νύχια, τα λεμφικά αγγεία και τα αιμοφόρα αγγεία (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Θηλώδης και Δικτυωτή Περιοχή του Χόριου

1.1.2.3. Υποδόριος Ιστός

Ο υποδόριος ιστός, ή αλλιώς υπόδερμα, είναι το κατώτερο στρώμα κάτω από το δέρμα και δεν αποτελεί μέρος του δέρματος, αλλά βρίσκεται κάτω από το χόριο της επιδερμίδας (Εικόνα 5) [1]. Σκοπός του είναι να προσκολλήσει το δέρμα στα υποκείμενα οστά και μυς καθώς και να το τροφοδοτήσει με αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Απαρτίζεται από χαλαρό συνδετικό ιστό, λιπώδη ιστό και ελασίνη.



Εικόνα 5: Υποδόριος Ιστός

1.2. Διαδερμική Διαπερατότητα

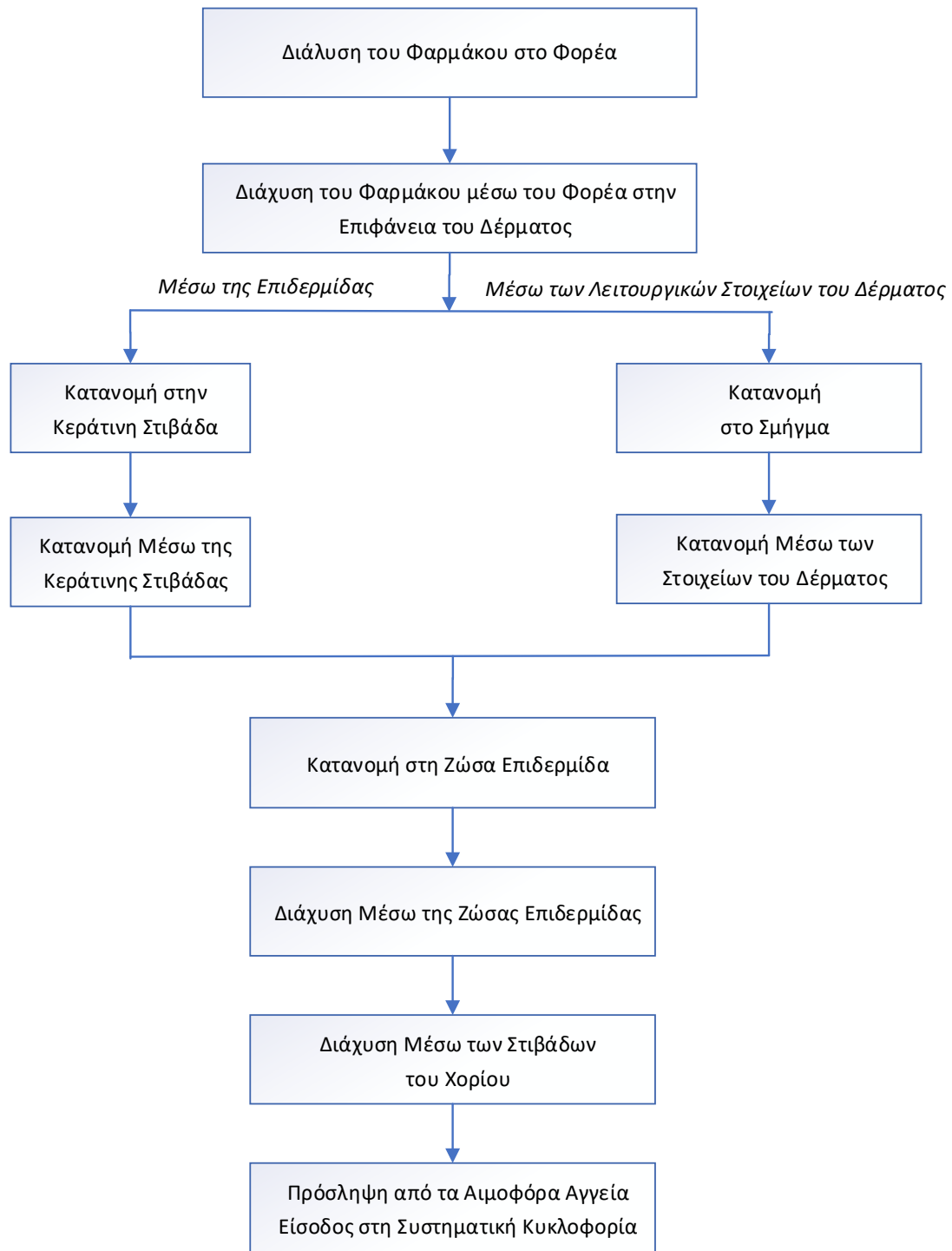
1.2.1. Εισαγωγή

Το ανθρώπινο δέρμα έχει χαμηλή διαπερατότητα [15], δηλαδή, οι περισσότερες ξένες ουσίες δεν μπορούν να διεισδύσουν και να διαχυθούν μέσω του δέρματος. Το εξώτερο στρώμα του δέρματος, η κεράτινη στιβάδα, ενεργεί ως φραγμός διαπερατότητας ενδογενών και εξωγενών ουσιών και, ως εκ τούτου, αποτελεί το καθοριστικό στοιχείο της κινητικής της διαδερμικής απορρόφησης μορίων [12].

Η στιβάδα αυτή, προστατεύει το σώμα από την είσοδο ανεπιθύμητων ουσιών, όπως οι τοξίνες, χωρίς να τους επιτρέπει να έρθουν σε επαφή με εσωτερικούς ιστούς. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι επιθυμητό να επιτρέπεται η είσοδος ορισμένων ουσιών στο σώμα για θεραπευτικούς, διαγνωστικούς ή / και

καλλωπιστικούς λόγους. Τα μόρια διαχέονται διαμέσου της κεράτινης στιβάδας και της ζώσας επιδερμίδας και τελικά καταλήγουν στην κυκλοφορία, μέσω των ανώτερων στοιβάδων του χορίου. Οι πιθανές ιατρικές εφαρμογές μιας τέτοιας μεταφοράς σωματιδίων, έχουν οδηγήσει σε σημαντικές εξελίξεις στη νανοϊατρική, στη βιολογία, αλλά και σε άλλες επιστήμες, προκειμένου να μελετηθεί η αύξηση της διαπερατότητας του δέρματος. Οι ερευνητές επιδιώκουν να στοχεύσουν την επιδερμίδα και άλλα στρώματα ενεργού κυτταρικής διαίρεσης, όπου τα νανοσωματίδια μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με κύτταρα που έχουν χάσει τους μηχανισμούς ελέγχου της ανάπτυξης (καρκινικά κύτταρα). Μια τέτοια άμεση αλληλεπίδραση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ακριβέστερη διάγνωση ιδιοτήτων συγκεκριμένων όγκων ή για τη θεραπεία τους με την παροχή φαρμάκων με κυτταρική εξειδίκευση.

Η διαδερμική οδός διαπερατότητας περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια (Εικόνα 6) και είναι δυνατός ο τερματισμός της διαδικασίας σε κάποιο ενδιάμεσο στάδιο.

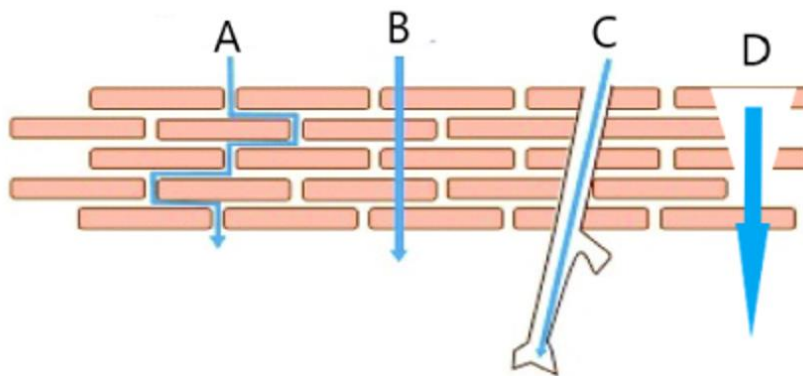


Εικόνα 6: Στάδια Διαδερμικής Απορρόφησης

1.2.2. Μηχανισμός Παθητικής Διάχυσης

Η διαπερατότητα του δέρματος και των υπολοίπων βιολογικών μεμβρανών, για την πλειονότητα των φαρμακομορίων, επιτυγχάνεται με το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης, μέσω:

- Παρακυτταρικής ή εξωκυτταρικής οδού (intercellular or paracellular or extracellular pathway) (A)
- Διακυτταρικής ή ενδοκυτταρικής οδού (intracellular or transcellular pathway) (B)
- Λειτουργικών στοιχείων του δέρματος (C)
- Μηχανικών μεθόδων απομάκρυνσης της κεράτινης στιβάδας και αύξησης της διαδερμικής απορρόφησης (D) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Μηχανισμοί Παθητικής Διάχυσης

Τα μόρια του φαρμάκου μπορούν να διασχίσουν τους κυτταρικούς φραγμούς, είτε μετακινούμενα μέσα στα κύτταρα (διακυτταρικής ή ενδοκυτταρικής οδού), είτε διερχόμενα μεταξύ των κυττάρων (παρακυτταρικής ή εξωκυτταρικής οδού). Ο φυσικός φραγμός της διακυτταρικής οδού είναι η λιπιδική μήτρα των μεμβρανών, ενώ της παρακυτταρικής οδού είναι οι μεσοκυτταρικές σφιχτές συνδέσεις. Πιο συγκεκριμένα, η λεγόμενη ενδοκυτταρική οδός, περιλαμβάνει μεσολάβηση του φορέα της ουσίας και μηχανισμούς μεταφοράς. Από την άλλη, η παρακυτταρική οδός περιγράφει την κίνηση μιας διαλυμένης ουσίας η οποία ακολουθεί την υδατική παρακυτταρική οδό, μέσω της οποίας υδρόφιλες ενώσεις σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους, ιόντα και λιπόφιλα μόρια διασχίζουν τους

επιθηλιακούς και ορισμένους ενδοθηλιακούς φραγμούς. Η παρακυτταρική διαδρομή αποδίδει πολύ ταχύτερη απορρόφηση λόγω του υψηλού συντελεστή διάχυσης των περισσότερων φαρμάκων. Αντιθέτως, για την ενδοκυτταρική οδό, λόγω της χαμηλής διαπερατότητας των μορίων μέσα από τα κερατινοκύτταρα, χρησιμοποιούνται ενισχυτές διαπερατότητας. [1, 12]

Επίσης, ένα μόριο μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη στιβάδα μέσω των ιδρωτοποιών αδένων ή τα θυλάκια των τριχών (transappendageal). Οι ιδρωτοποιοί αδένες και τα θυλάκια των τριχών καταλαμβάνουν μόνο το 0.1% της συνολικής επιφάνειας του δέρματος και έτσι η συγκεκριμένη οδός δεν θεωρείται σημαντική, όμως μπορεί να συμβάλει στην διείσδυση ενώσεων κατά τα πρώτα στάδια της διάχυσης. [13]

Τέλος, επειδή το δέρμα αποτελεί φραγμό στην απορρόφηση των περισσότερων φαρμάκων, χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μηχανισμών για την ενίσχυση της διαδερμικής διείσδυσης, όπως:

- Υπερκορεσμός
- Νερό (ενυδάτωση)
- Άλλοι χημικοί παράγοντες
- Φυσικές διατάξεις ελέγχου της δερματικής διαπερατότητας
 - Υπέρηχοι
 - Ιοντοφόρηση
 - Ηλεκτροφόρηση
- Μεταφορείς Ουσιών
 - Νανογαλακτώματα
 - Λιποσώματα
 - Νανοςωματίδια [14]

1.2.3. Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Διαδερμική Απορρόφηση

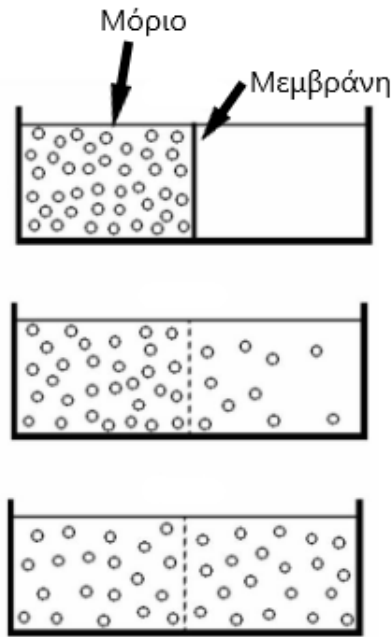
Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση των φαρμακομορίων, είναι οι ακόλουθοι[1]:

- *Βιολογικοί παράγοντες όπως:*
 - Ηλικία του δέρματος
 - Κατάσταση του δέρματος
 - Είδος Δέρματος
 - Ανατομική περιοχή του δέρματος
 - Ροή του αίματος
 - Μεταβολισμός από το δέρμα
- *Φυσικοχημικοί παράγοντες, όπως:*
 - Θερμοκρασία
 - Ενυδάτωση του δέρματος
 - Φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου
 - Συγκέντρωση του φαρμάκου
 - Φορέας του φαρμάκου
 - Αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-δέρματος

1.3. Κινητική της Διαδερμικής Απορρόφησης

1.3.1. Θεωρία της Διάχυσης

Κάθε διέλευση εντός και μέσω του δέρματος διέπεται από διαδικασίες διάχυσης, και πιο συγκεκριμένα, παθητικής διάχυσης. Γενικά, ως διάχυση, ή παθητική μεταφορά, χαρακτηρίζεται η τάση των μορίων μιας ουσίας να διασπείρονται από περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης προς περιοχές μικρότερης συγκέντρωσης, εξαιτίας αυθόρμητης συνοριακής κίνησης (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Παθητική Μεταφορά Μάζας

Η τάση αυτή εκδηλώνεται με αντίστοιχη μετακίνηση των μορίων. Αυτό σημαίνει πως η μετακίνηση των μορίων γίνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις, με μεγαλύτερο ρυθμό από τη περιοχή της υψηλότερης προς την περιοχή χαμηλότερης συγκέντρωσης. Κάποια στιγμή οι συγκεντρώσεις εξισώνονται, πράγμα όμως, που δεν εμποδίζει την μετακίνηση των μορίων η οποία συνεχίζεται, αυτή τη φορά, με σταθερό ρυθμό.

1.3.2. Νόμοι της Διάχυσης

Υπάρχουν δύο νόμοι του Adolf Fick και αφορούν τη διάχυση. Γενικά, όταν η συγκέντρωση ύλης δεν είναι ομοιόμορφη σε ένα χώρο, τότε αυτή ρέει σε αυτόν τον χώρο. Το αποτέλεσμα της ροής είναι να μεταβάλλεται η συγκέντρωση μέχρι να δημιουργηθεί μια δυναμική ισορροπία, δηλαδή να μη μεταβάλλεται η συγκέντρωση (αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν ροές οι οποίες αλληλοεξουδετερώνονται).

❖ 1^{ος} νόμος του Fick

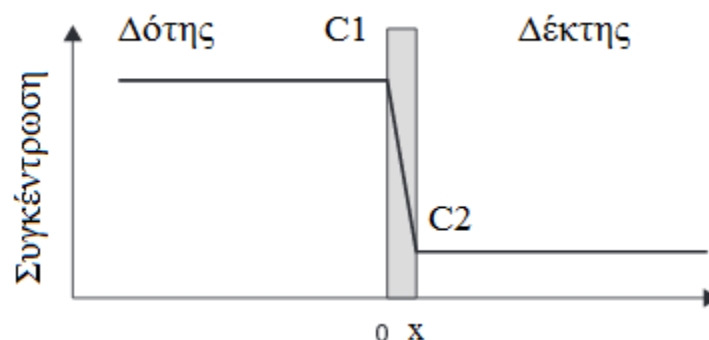
Ο πρώτος νόμος του Fick συσχετίζει τη ροή διάχυσης με τη βαθμίδα της συγκέντρωσης. Υποθέτει ότι η ροή οδεύει από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης, με μέγεθος που είναι ανάλογο με τη βαθμίδα συγκέντρωσης (χωρική παράγωγος), ή με απλούς όρους, ότι μια διαλυμένη ουσία θα μετακινηθεί από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης σε μια κλίση συγκέντρωσης. Έτσι θα ισχύει:

$$J = -D \cdot \frac{dC}{dx} \quad \text{Εξίσωση 1.1}$$

Όπου:

- D είναι ο συντελεστής διάχυσης (cm²/sec),
- C η συγκέντρωση των μορίων της ουσίας (g/cm³), x η απόσταση που διανύει η ουσία κάθετα προς την επιφάνεια του φραγμού (cm) και
- J η ροή διάχυσης (g/cm²sec).

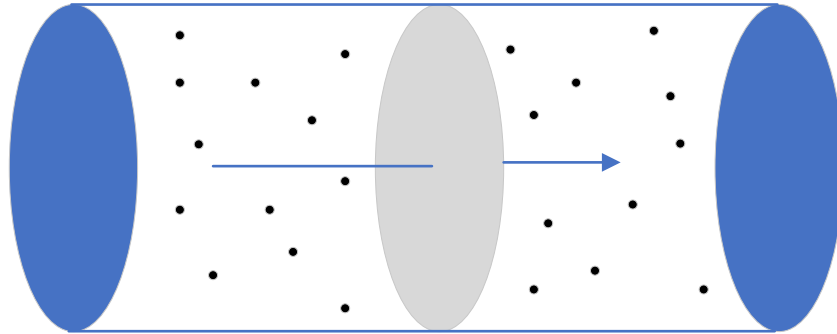
Ο παράγοντας dC/dx εκφράζει την ανομοιομορφία της κατανομής στο συγκεκριμένο σημείο. Στην Εξίσωση 1, το αρνητικό πρόσημο δηλώνει τη φορά της διάχυσης, δηλαδή, από θέσεις μεγαλύτερης συγκέντρωσης του διαχεόμενου στοιχείου προς θέσεις μικρότερης συγκέντρωσης και, έτσι, η ροή είναι πάντα μια θετική ποσότητα (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Απεικόνιση της Παθητικής Διάχυσης (C1>C2) [2]

Η ροή (Εικόνα 9) ορίζεται ως η ποσότητα της ύλης M , που διαχέεται στη μονάδα του χρόνου t , ανά μονάδα επιφάνειας s , και συμβολίζεται:

$$J = \frac{dM}{sdt} \quad \text{Εξίσωση 1.2}$$



Εικόνα 9: Ροή Μάζας M

Η κίνηση της μάζας θα σταματήσει όταν επέλθει εξισορρόπηση στη συγκέντρωση ανάμεσα στις δύο θέσεις. Δηλαδή, όταν ο παράγοντας dC/dx τείνει να μηδενιστεί.

Η κατάσταση κατά την οποία η συγκέντρωση του διαχεόμενου μορίου δε μεταβάλλεται με το χρόνο, ονομάζεται σταθερή κατάσταση (steady state).

❖ 2ος νόμος του *Fick*

Ο δεύτερος νόμος του *Fick* περιγράφει την δυναμική (non-steady state) διάχυση. Έτσι:

$$-\frac{\partial J}{\partial x} = \frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad \text{Εξίσωση 1,3}$$

Αν θεωρήσουμε ότι ο συντελεστής διάχυσης δεν μεταβάλλεται με την απόσταση ή την συγκέντρωση τότε η παραπάνω σχέση απλοποιείται στην:

$$-\frac{\partial J}{\partial x} = \frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right) \quad \text{Εξίσωση 1.4}$$

Ο δεύτερος νόμος του *Fick* προβλέπει ότι η διάχυση κάνει τη συγκέντρωση να αλλάζει σε οποιοδήποτε σημείο, και όχι σε μια μονάδα επιφάνειας του φράγματος, με βάση το χρόνο.

Ο συντελεστής διάχυσης D στα στερεά έχει βρεθεί ότι υπακούει στην εξίσωση Arrhenius:

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right) \quad \text{Εξίσωση 1.5}$$

όπου

- D είναι ο συντελεστής διάχυσης (σε m^2/s),
- D_0 είναι ο μέγιστος συντελεστής διάχυσης (σε άπειρη θερμοκρασία, σε m^2/s),
- E_A είναι η ενέργεια ενεργοποίησης για τη διάχυση (σε J/mol),
- T είναι η απόλυτη θερμοκρασία (σε K),
- $R \approx 8,31446 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ είναι η σταθερά Boltzmann ανά mol.

Και για τα υγρά το D βρέθηκε ότι υπακούει στην εξίσωση Stokes – Einstein, η οποία προβλέπει ότι:

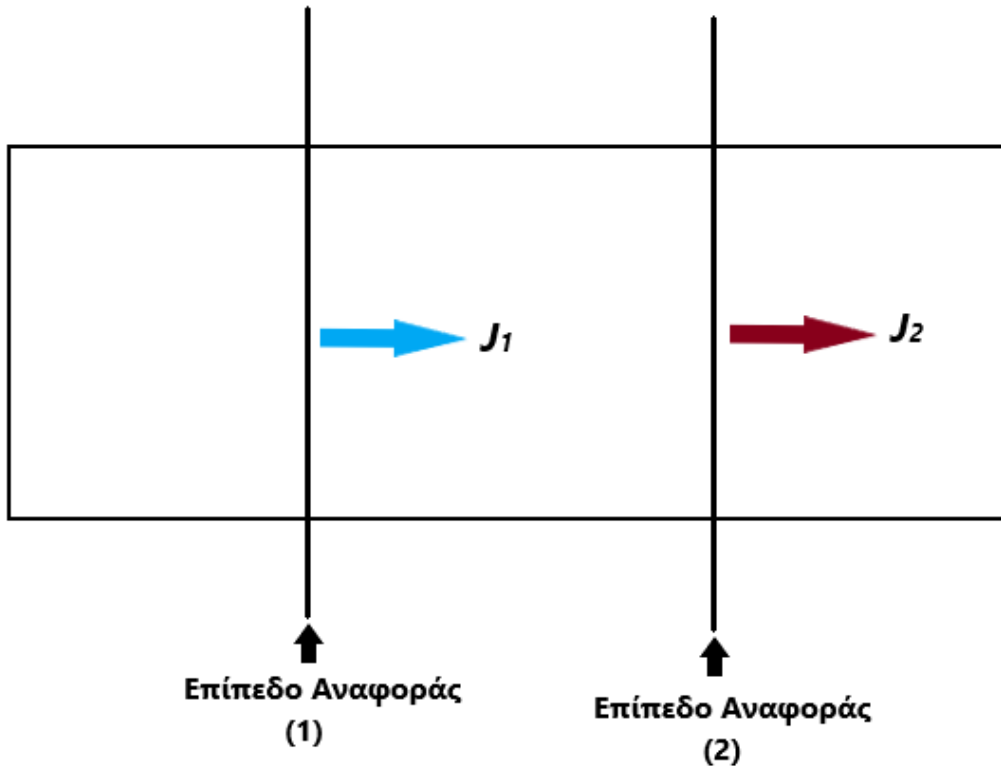
$$\frac{D_{T_1}}{D_{T_2}} = \frac{T_1}{T_2} \frac{\mu_{T_2}}{\mu_{T_1}} \quad \text{Εξίσωση 1.6}$$

- D είναι ο συντελεστής διάχυσης,
- T_1 και T_2 είναι οι αντίστοιχες απόλυτες θερμοκρασίες,
- μ είναι το δυναμικό ιξώδες του διαλύτη

Έτσι, η διάχυση της ουσίας εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της, καθώς επίσης και από τους παράγοντες της θερμοκρασίας, την ενέργεια ενεργοποίησης, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου του διαλύτη, την αλληλεπίδραση με τον διαλύτη και το ιξώδες του διαλύτη.

Θα πρέπει επομένως, να ληφθούν υπόψη τα διάφορα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του δέρματος οι οποίες επηρεάζουν και μπορούν να μεταβάλλουν τη διάχυση του δέρματος.

Κάθε σημείο του χώρου μπορεί να έχει μια διαφορετική ροή (Εικόνα 10). Ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης είναι ανάλογος της διαφοράς της ροής από το ένα μέρος του χώρου στο άλλο.

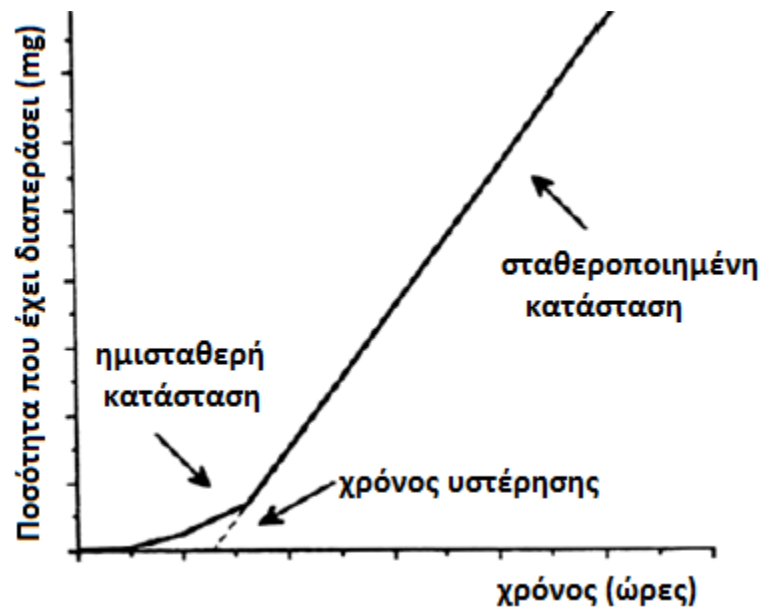


Εικόνα 10: 2^{ος} νόμος Fick - Η Ροή Διαφέρει από το Ένα Σημείο του Χώρου στο Άλλο

Η συγκέντρωση της ουσίας υφίσταται μείωση με το χρόνο, καθώς αυτή διαχέεται στη μεμβράνη, και ταυτόχρονα αυξάνεται, καθώς εισέρχεται σε αυτή έως ότου οι δύο συγκεντρώσεις έλθουν σε ισορροπία, δηλαδή όταν ο όρος dC/dt μηδενιστεί. Η σταθεροποίηση της συγκέντρωσης επέρχεται άμεσα, αλλά διαφέρει ελαφρώς με το χρόνο και η κατάσταση αυτή αναφέρεται ως ημισταθερή κατάσταση (quasistationary state). Ο απαιτούμενος χρόνος για την επίτευξη ομοιόμορφης συγκέντρωσης της ουσίας μέσα στη μεμβράνη είναι γνωστός ως χρόνος υστέρησης, t_L (Διάγραμμα 2).

Ο χρόνος υστέρησης δίνεται από την Εξίσωση 5:

$$t_L = \frac{h^2}{6 \times D} \quad \text{Εξίσωση 1.5}$$



Διάγραμμα 2: Απαιτούμενη Χρόνος για Επίτευξη Σταθεροποιημένης Κατάστασης
(Χρόνος Υστέρησης, τ_l) [2]

1.3.3. Παράγοντες Καθορισμού της Διαδερμικής Διάχυσης

Σε γενικές γραμμές, η διάχυση του φαρμάκου στην κεράτινη στιβάδα καθορίζεται σε ένα σημαντικό βαθμό από την ίδια την κεράτινη στιβάδα και από φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου. Μερικές από αυτές είναι (Εικόνα 11):

- Το σημείο τήξεως
- Το φορτίο
- Οι δεσμοί Υδρογόνου
- Η διαλυτότητα
- Η λιποφιλία
- Η υδροφιλία
- Το μέγεθος
- Η κατανομή φορτίου
- Ο ιονισμός
- Η μοριακή δομή

- **Ελεγχόμενη Διαδερμική Χορήγηση (Transdermal Therapeutics Systems – TTS)**

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαπερνά την κερατίνη στιβάδα και εισέρχεται στα τριχοειδή αγγεία της επιδερμίδας και από εκεί στη γενική κυκλοφορία είναι αρκετή, προκειμένου να επιτευχθεί η συστηματική θεραπεία (κατανομή του φαρμάκου στον οργανισμό). [1]

1.4 Ενισχυτές Διαπερατότητας

1.4.1. Γενικά

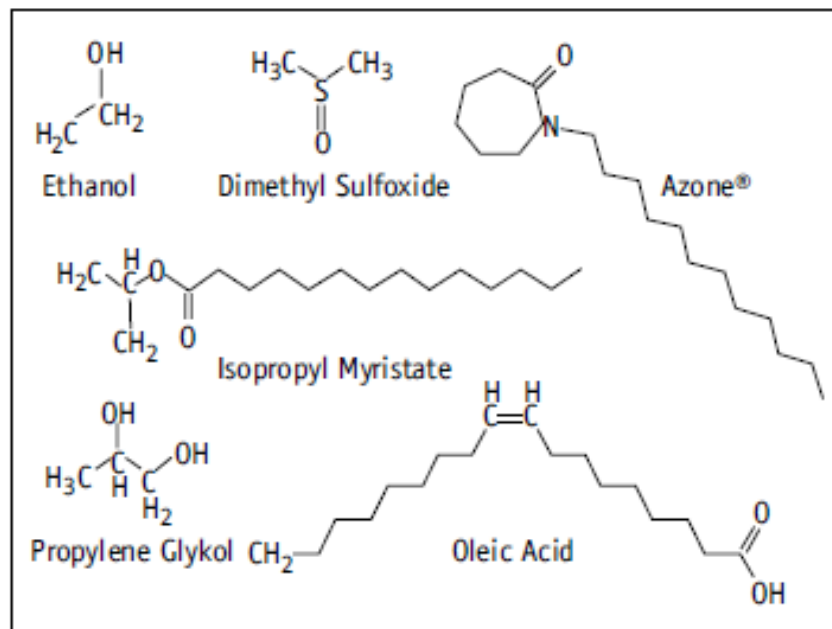
Οι ενισχυτές διαπερατότητας χρησιμοποιούνται, προκειμένου να αρθεί η αντίσταση της κερατίνης στιβάδας, μέσω της ενσωμάτωσής τους στα τοπικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων. [8] Ένας ιδανικός ενισχυτής διαπερατότητας, θεωρείται ότι είναι μία χημική ένωση η οποία κατέχει την μοναδική ιδιότητα να μειώνει αντιστρεπτά την αντίσταση του φραγμού του SC, χωρίς να προκαλεί μόνιμη βλάβη στα κύτταρα. Οι ενισχυτές διαπερατότητας δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς και η επίδρασή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου [5]. Τα περισσότερα χημικά ενισχυτικά διαπερατότητας επηρεάζουν τη διάχυση του φαρμάκου από το σύστημα μεταφοράς στο SC, είτε μεταβάλλοντας τη διαλυτότητα του φαρμάκου, είτε μεταβάλλοντας τη δομή του SC, έτσι ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητα του φαρμάκου στο SC.

Η επιθυμητές ιδιότητες που πρέπει να έχει ένας ιδανικός ενισχυτής διαπερατότητας είναι οι ακόλουθες:

- Να είναι μη τοξικός, μη ερεθιστικός και μη αλλεργιογόνος.
- Να έχει προβλεπόμενη και κατάλληλης διάρκειας δράσης ανάλογα με το υπό χρήση φάρμακο.
- Να έχει ταχεία έναρξη δράσης.
- Να είναι φαρμακολογικά ανενεργός.
- Να είναι χημικά και φυσικά συμβατός με το σύστημα χορήγησης.
- Να ενσωματώνεται εύκολα στο σύστημα χορήγησης.

- Να μεταβάλει αντιστρεπτά της ιδιότητες του φραγμού του SC.
- Η λειτουργία του φραγμού του δέρματος θα πρέπει να μειώνεται προς μία κατεύθυνση μόνο, και να μην παρατηρείται αποβολή ενδογενούς υλικού.
- Να είναι φθηνός και αποδεκτός στην κοσμετολογία. [1]

Υπάρχει σήμερα εκτεταμένη έρευνα, όσον αφορά τη δυνατότητα χρήσης ενισχυτών διαπερατότητας, ως εργαλεία στην τοπική – διαδερμική χορήγηση φαρμάκων. Οι χημικοί ενισχυτές διαπερατότητας περιλαμβάνουν διαλύτες (όπως νερό, αλκοόλες, και άλλα). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενισχυτών διαπερατότητας που είναι φαίνονται στην Εικόνα 12 [16].



Εικόνα 12: Χημικές Δομές Τυπικών Χημικών Ενισχυτών Διαπερατότητας [14]

1.4.2. Παράγοντες Οπτικού Καθαρισμού (Optical Clearing Agents – OCAs)

Η βιοϊατρική φωτονική, είναι ένα από τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα πεδία στις βιοεπιστήμες, που συνδέει την έρευνα στη φυσική, την οπτική με ιατρικές ή βιολογικές εφαρμογές. Επιτρέπει τη δομική και λειτουργική ανάλυση ιστών και κυττάρων με ανάλυση και αντίθεση που δεν είναι εφικτή με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο. Ωστόσο, μείζονες προκλήσεις συνδέονται με την ανάγκη να ενισχυθεί η

ανάλυση της απεικόνισης ακόμη περισσότερο στο υποκυτταρικό επίπεδο για μεγαλύτερα μπλοκ ιστών ή όργανα, καθώς και για μελέτες *in vivo*.

Οι βιολογικοί ιστοί γενικά χαρακτηρίζονται από ισχυρή σκέδαση φωτός, η οποία αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην εφαρμογή των οπτικών μεθόδων στην κλινική πράξη [27]. Οι ιστοί έχουν ετερογενή σύνθεση, καθώς πρωτεϊνικοί ιστοί και σφαιρίδια, κύτταρα, σταγονίδια λιπιδίων και μεμβράνες φωσφολιπιδίων κατανέμονται σε ένα υγρό υπόβαθρο, που ονομάζεται διάμεσο υγρό (Interstitial Fluid-ISF). Τα ιστικά κύτταρα παρουσιάζουν παρόμοια ετερογενή σύνθεση, καθώς ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια και τα οργανίδια περιβάλλονται από το κυτταρόπλασμα [3]. Τόσο το ISF όσο και το κυτταρόπλασμα αποτελούνται κυρίως από νερό (>90% σε όγκο), όπου ορισμένα άλατα, μέταλλα και πρωτεΐνες διαλυτοποιούνται. Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε νερό στους ιστούς, ο δείκτης διάθλασης (Refractive Index-RI) είναι χαμηλός σε σύγκριση με τον RI των σκεδαστών στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτή η διαφορά στο RI είναι υπεύθυνη για την ισχυρή σκέδαση του φωτός στους ιστούς. Ένας τρόπος για να ποσοτικοποιηθεί μια τέτοια σκέδαση σε έναν ιστό είναι να αξιολογηθεί ο σχετικός RI m , που υπολογίζεται από την αναλογία μεταξύ του RI των σκεδαστών ιστού (n_{scat}) και του RI του ISF (n_{ISF}):

$$m = \frac{n_{scat}}{n_{ISF}} \quad \text{Εξίσωση 1.8}$$

Το μέγεθος του m είναι ένα μέτρο αυτής της σκέδασης φωτός. Είναι σύνηθες να υπολογίζουμε το m για 589.6 nm, αλλά επειδή τόσο το n_{scat} , όσο και το n_{ISF} εξαρτώνται από το μήκος κύματος (λ), το m θα εξαρτάται επίσης από το λ . Λαμβάνοντας υπόψη το $\lambda = 589.6$ nm και τους ιστούς σε θερμοκρασία 20 °C, το n_{ISF} θα κυμαίνεται μεταξύ 1.35 και 1.37. Αυτές οι χαμηλές τιμές για το RI του ISF εμφανίζονται επειδή το ISF περιέχει κυρίως νερό και μια μικρή ποσότητα διαλυμένων οργανικών ενώσεων και αλάτων. Λαμβάνοντας υπόψη τους σκεδαστές ιστών, οι τιμές για το n_{scat} θα είναι σημαντικά υψηλότερες. Η υψηλή σκέδαση των θολών ιστών περιορίζει τη διείσδυση του ορατού και του εγγύς υπέρυθρου φωτός και τόσο η ανάλυση της εικόνας, όσο και η αντίθεση μειώνονται, καθώς το φως διαδίδεται βαθύτερα στον ιστό. Για την εκτέλεση βαθύτερης απεικόνισης ιστού, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές οπτικής

απεικόνισης. Εναλλακτικά, η μείωση της διασποράς και της απορρόφησης των ιστών θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει σημαντικά την οπτική απεικόνιση των δομών του εν τω βάθει ιστού. Ο τρόπος, προκειμένου να αυξηθεί η διαφάνεια των ιστών είναι να αυξηθεί ιδανικά το n_{ISF} στα επίπεδα του n_{scat} . Σε αυτή την περίπτωση, το m θα μειωνόταν στο 1 και ο ιστός θα ήταν εντελώς διαφανής, ή με άλλα λόγια, η σκέδαση φωτός θα εξαλειφόταν. Ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη μείωση του m και τη σκέδαση του φωτός στους ιστούς είναι, αντικαθιστώντας το διάμεσο νερό με ένα αβλαβές ρευστό οπτικού καθαρισμού, που παρουσιάζει υψηλότερο RI από το νερό και ταιριάζει καλύτερα με την τιμή του n_{scat} . Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες οπτικού καθαρισμού με τέτοιου είδους παράγοντες, όπου η κινητική m υπολογίστηκε από μετρήσεις πάχους (d) και που έγιναν κατά τη διάρκεια επεξεργασιών οπτικού καθαρισμού. Για τον υπολογισμό της κινητικής του n_{ISF} , προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην Εξίσωση 1.6, ήταν πρώτα απαραίτητο να ανακτήσουμε την κινητική του συντελεστή σκέδασης (μ_s (λ)) από τις μετρήσεις T_c και πάχους (d) μέσω της εξίσωσης Bouguer–Beer–Lambert:

$$T_c = e^{-\mu_t d} \quad \text{Εξίσωση 1.9}$$

Όπου, το μ_t αντιπροσωπεύει τον συντελεστή εξασθένησης, που είναι το άθροισμα του συντελεστή απορρόφησης (μ_a) και του συντελεστή σκέδασης μ_s . Χρησιμοποιώντας φασματικές μετρήσεις T_c και γνωρίζοντας την εξάρτηση μήκους κύματος για τον μ_a , η εξάρτηση μήκους κύματος μ_s μπορεί να υπολογιστεί μέσω της Εξίσωσης 1.7. Μόλις ληφθεί το μ_s (λ), η κινητική για το n_{ISF} (λ) θα μπορούσε να υπολογιστεί με την Εξίσωση 1.8 όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία:

$$n_{ISF}(\lambda, t) = \frac{n_{scat}(\lambda, t = 0)}{\left(\sqrt{\frac{\mu_s(\lambda, t) \times d(t)}{\mu_s(\lambda, t = 0) \times d(t = 0)}} \times \left(\frac{n_{scat}(\lambda, t = 0)}{n_{ISF}(\lambda, t = 0)} - 1 \right) + 1 \right)} \quad \text{Εξίσωση 1.10}$$

Στην Εξίσωση 1.10, το $n_{scat}(\lambda, t=0)$ είναι η διασπορά των σκεδαστών, η οποία παραμένει αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της απεικόνισης, και το $n_{ISF}(\lambda, t=0)$ είναι η διασπορά του ISF στον μη επεξεργασμένο ιστό. Τα μ_s ($\lambda, t=0$) και $d(t=0)$ είναι η

εξάρτηση από το μήκος κύματος για το συντελεστή σκέδασης και το πάχος του δείγματος για τον φυσικό ιστό. Αντίστοιχα, το $d(t)$ είναι το πάχος του δείγματος σε οποιαδήποτε στιγμή της απεικόνισης, το οποίο πρέπει να μετρηθεί, και $\mu_s(\lambda, t)$ είναι ο συντελεστής σκέδασης για οποιοδήποτε μήκος κύματος.

Επιπλέον, οι Wen et al. [27] διερεύνησαν περαιτέρω τη σχέση μεταξύ του μειωμένου συντελεστή σκέδασης και του RI των παραπάνω παραγόντων με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Βρέθηκε ότι η διασπορά του μείγματος μειώνεται με την αύξηση του RI του περιβάλλοντος μέσου (n_b). Ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ του μειωμένου συντελεστή σκέδασης και το RI περιβάλλοντος μέσου είναι περίπου 0.97. Βάζοντας τα δεδομένα του πειράματος, θα μπορούσαμε να λάβουμε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\mu'_s = k \left(\frac{1.475}{n_b} - 1 \right)^{2.09} \quad \text{Εξίσωση 1.11}$$

με $k=739.8$, όπου k είναι μια σταθερά που σχετίζεται με το μέγεθος των σωματιδίων και την πυκνότητα όγκου των σωματιδίων [136]. Επομένως, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αυτόν τον τύπο για να προβλέψουμε την αλλαγή στην ιδιότητα σκέδασης που προκαλείται από τα μέσα οπτικού καθαρισμού [27].

Φαίνεται λοιπόν, ότι ο οπτικός καθαρισμός είναι μια ευέλικτη προσέγγιση για τη βελτίωση της ποιότητας απεικόνισης και του βάθους της οπτικής μικροσκοπίας, μειώνοντας το σκεδαζόμενο φως [17]. Η τεχνική οπτικού καθαρισμού ιστών έχει δείξει μεγάλες δυνατότητες στην ενίσχυση των δυνατοτήτων των μη επεμβατικών τεχνικών διάγνωσης και απεικόνισης που βασίζονται στο φως, λόγω της αυξημένης διείσδυσης φωτός στον ιστό.

Η μελέτη των οπτικών παραγόντων καθαρισμού (Optical Clearing Agents – OCAs), ικανών να μειώσουν τη σκέδαση στους βιολογικούς ιστούς, να ενισχύσουν την αντίθεση της εικόνας και να αυξήσουν το βάθος διείσδυσης της εικόνας είναι σχετικά πρόσφατη. Τα τελευταία χρόνια, τα OCAs έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό και με επιτυχία για τη μείωση της διασποράς, τόσο σε σταθερά τμήματα ζωικού, όσο και φυτικού ιστού, καθώς και σε δείγματα όγκου, αποδεικνύοντας τα οφέλη τους στην παροχή βαθύτερης ικανότητας απεικόνισης,

για μια μεγάλη ποικιλία οπτικών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής τομογραφίας συνοχής (Optical Coherence Tomography – OCT).

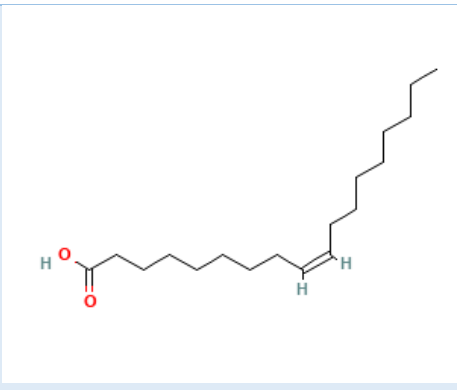
Ένας από τους τρέχοντες περιορισμούς της *Οπτικής Τομογραφίας Συνοχής (OCT)* είναι το βάθος διείσδυσης της και η αντίθεση απεικόνισης, λόγω της πολύπλοκης μορφολογικής φύσης του βιολογικού ιστού, ιδιαίτερα του δερματικού ιστού[19]. Οι οπτικοί καθαριστικοί παράγοντες (OCAs), με υψηλότερους δείκτες διάθλασης, θα πρέπει να επάγουν καλύτερη οπτική καθαριστική αποτελεσματικότητα στους βιολογικούς ιστούς, καθώς έχουν ετερογενείς δομές, καθιστώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιστών και διαφορετικών OCAs πολύ περίπλοκες [9]. Προκειμένου να διευκολυνθεί η κλινική διαθεσιμότητα της τεχνικής οπτικού καθαρισμού ιστού με τη χρήση υπερωσμητικών παραγόντων, χρησιμοποιείται το ελαϊκό οξύ (Oleic Acid - OA), ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ που γενικά πιστεύεται ότι είναι ασφαλές, ως ενισχυτικό και της προπυλενογλυκόλης ((Propylene Glycol - PG) στην οπτική κάθαρση του ιστού του δέρματος in vitro [18].

1.4.2.1. Ελαϊκό Οξύ (Oleic Acid - OA)

Το ελαϊκό οξύ (OA) είναι ένα μονοακόρεστο λιπαρό οξύ και χρησιμοποιείται ευρέως ως ασφαλής διαδερμικός ενισχυτής στον τομέα της χορήγησης φαρμάκων. Όσον αφορά τον οπτικό καθαρισμό του δέρματος, το OA λειτουργεί ως προαγωγέας για τη διευκόλυνση των OCAs να διεισδύσουν στον ιστό του δέρματος [20].

Το OA διαθέτει μια υδρόφοβη ουρά και μια υδρόφιλη κεφαλή, δομή σημαντική για το πώς το μόριο αλληλεπιδρά με τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι, το OA λειτουργεί διεισδύοντας στη λιπιδική δομή, με το πολικό της άκρο κοντά στις πολικές κεφαλές των λιπιδίων. Λόγω της κυρτής δομής του, διαταράσσει και αυξάνει τη ρευστότητα της λιπιδικής περιοχής [18].

Τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, καθώς και η δομή του ελαϊκού οξέος είναι τα εξής (Πίνακας 1):

Χαρακτηριστικό	Τιμή - Τύπος
Μοριακός Τύπος	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Συντακτικός Τύπος	C ₈ H ₁₇ CH=CH (CH ₂) ₇ COOH
Στερεοχημικός Τύπος	
Μοριακό βάρος	282.468 g/mol
Πυκνότητα	0.895 g/cm ³
Σημείο Τήξης	13 - 14 °C
Σημείο Βρασμού	360 °C
Διαλυτότητα στο Νερό	Αδιάλυτο
Διαλυτότητα στην Αιθανόλη	Διαλυτό

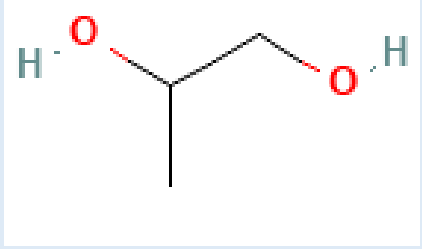
Πίνακας 1: Δομή και Φυσικά - Χημικά Χαρακτηριστικά του Ελαϊκού οξέος

1.4.2.2. Προπυλενογλυκόλη (Propylene Glycol - PG)

Η προπυλενογλυκόλη (PG) κατατάσσεται στην κατηγορία των διολών και αποτελείται από δύο ομάδες υδροξυλίου (-OH), καθιστώντας το ένα έντονα υδρόφιλο μόριο, με μοριακό βάρος 76.09 g/mol [21]. Είναι αναμίξιμη με ένα ευρύ φάσμα διαλυτών, συμπεριλαμβανομένου του νερού. Γενικά οι γλυκόλες δεν είναι ερεθιστικές και έχουν πολύ χαμηλή πτητικότητα. Η προπυλενογλυκόλη χρησιμοποιείται σε πολλά φαρμακευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων ενέσιμων και τοπικών σκευασμάτων. Προκειμένου λοιπόν, να ενισχυθεί όχι μόνο η ικανότητα απεικόνισης του βάρους, αλλά και η αντίθεση απεικόνισης του OCT, καθώς και η επίδραση του οπτικού καθαρισμού των τοπικά εφαρμοζόμενων οπτικών παραγόντων καθαρισμού (OCAs), μπορεί να γίνει χρήση της προπυλενογλυκόλης [23]. Έτσι, μετά τη χρήση της, έχουμε μείωση του

συντελεστή σκέδασης κατά τη διενέργεια οπτικών τεχνικών, όπως αυτή του OCT [22].

Τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά, καθώς και η δομή της προπυλενογλυκόλης είναι τα εξής (Πίνακας 2):

Χαρακτηριστικό	Τιμή - Τύπος
Μοριακός Τύπος	$C_3H_8O_2$
Συντακτικός Τύπος	$CH_3CH(OH)CH_2OH$
Στερεοχημικός Τύπος	
Μοριακό βάρος	76.09 g/mol
Πυκνότητα	1.036 g/cm ³
Σημείο Τήξης	-59 °C
Σημείο Βρασμού	188,2 °C
Διαλυτότητα στο Νερό	Αναμίξιμο
Διαλυτότητα στην Αιθανόλη	Αναμίξιμο

Πίνακας 2: Δομή και Φυσικά - Χημικά Χαρακτηριστικά της Προπυλενογλυκόλης

Επισκόπηση των Μεθόδων Καθαρισμού Ιστών

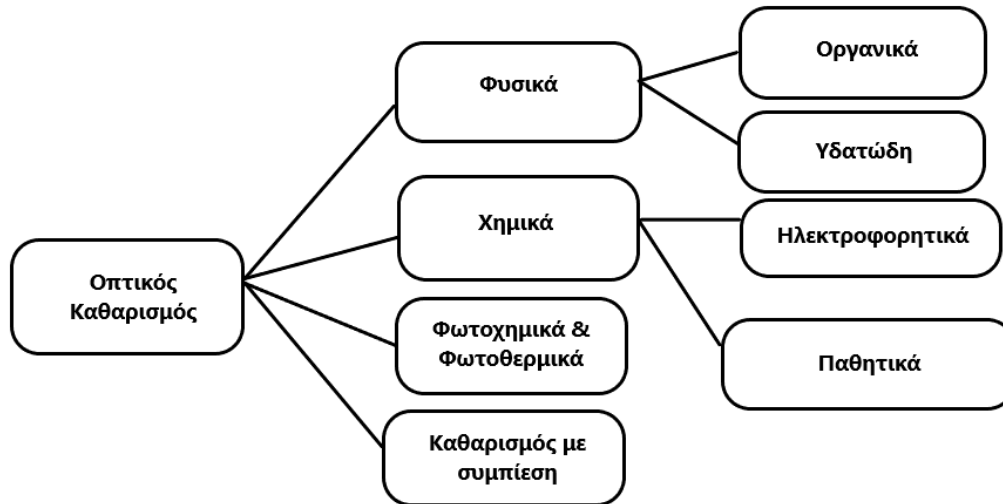
Κάθε τεχνική οπτικής απεικόνισης περιορίζεται στο βάθος διείσδυσής της από τη σκέδαση που εμφανίζεται σε βιολογικούς ιστούς. Πιθανές λύσεις για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα συνίστανται στον περιορισμό των επιζήμιων επιπτώσεων της σκέδασης με τη μείωση των οπτικών ανομοιογενειών εντός του δείγματος. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, είτε με τη χρήση φυσικών μεθόδων (όπως τα διαλύματα αντιστοίχισης του δείκτη διάθλασης), είτε με χημικές μεθόδους (όπως η αφαίρεση των σκευαστών) που βασίζονται σε πρωτόκολλα μετασχηματισμού ιστών. Παρακάτω παρατίθεται μια επισκόπηση των τρεχουσών μεθόδων αιχμής που χρησιμοποιούνται τόσο για *ex-vivo*, όσο και για *in-vivo* οπτικό καθαρισμό βιολογικών ιστών.

Αρχικά, παρατίθεται ένα σύντομο ιστορικό της ανάπτυξης των πιο διαδεδομένων μεθόδων οπτικής κάθαρσης και στη συνέχεια, περιγράφονται οι αρχές λειτουργίας, τόσο των φυσικών, όσο και των χημικών μεθόδων. Στη συνέχεια, εξετάζονται οι μέθοδοι καθαρισμού, στρέφοντας την προσοχή, τόσο σε φυσικές, όσο και σε χημικές μεθόδους, ταξινομημένες με βάση το μέγεθος και τον τύπο ιστού για κάθε συγκεκριμένη εφαρμογή. Ένα μικρό τμήμα προορίζεται για μεθόδους που έχουν ήδη βρει εφαρμογές *in vivo* σε ερευνητικό επίπεδο.

2.1. Η Τεχνική

Ο οπτικός καθαρισμός ιστού μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, όπως φυσική, χημική, φωτοχημική/φωτοθερμική τεχνική και συμπίεση. Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου πρωτοκόλλου καθαρισμού

εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος και τις φυσικές ιδιότητες του αναλυόμενου δείγματος ιστού [7]. Το σχηματικό διάγραμμα που παρουσιάζεται στην Εικόνα 13, συνοψίζει τις κύριες τεχνικές κάθαρσης [120].

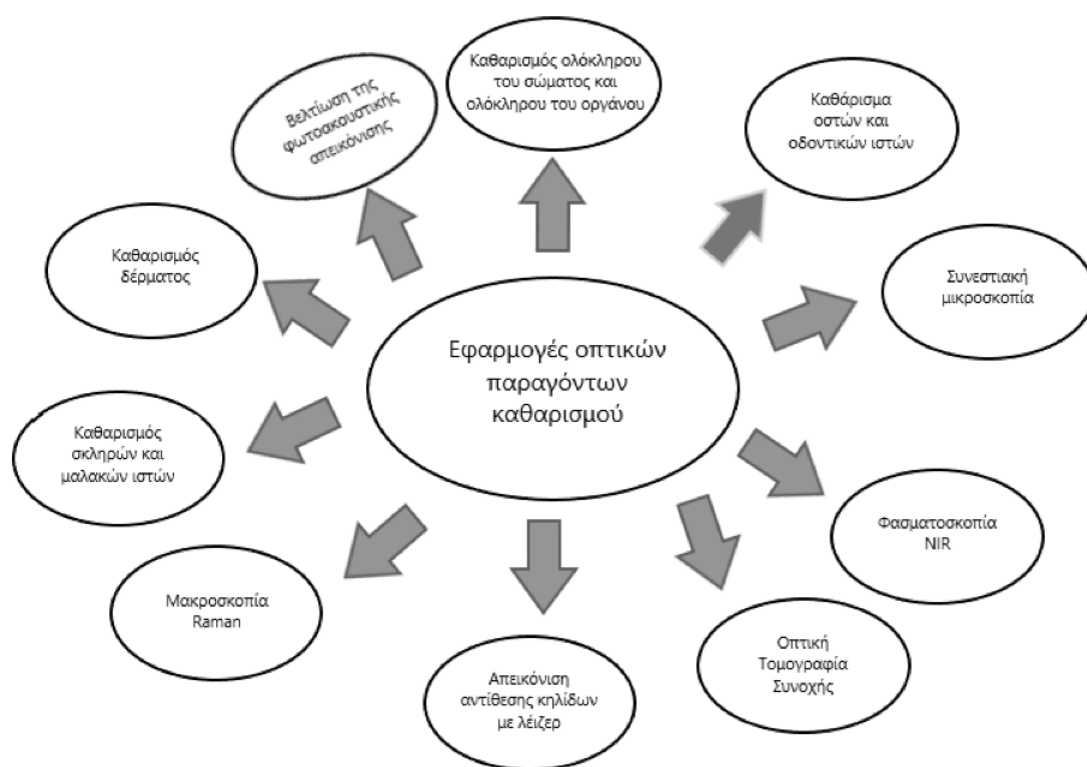


Εικόνα 13: Είδη Οπτικού Καθαρισμού

Σε κάθε οπτική και μικροσκοπική τεχνική, η σε βάθος ικανότητα απεικόνισης, σε ένα βιολογικό δείγμα, εξαρτάται από το περιορισμένο βάθος διείσδυσης του φωτός μέσα στους βιολογικούς ιστούς οι οποίοι είναι οπτικά μέσα που χαρακτηρίζονται από υψηλή θολότητα [28]. Ακόμα κι αν αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό εδώ και πολύ καιρό, η μελέτη των οπτικών παραγόντων καθαρισμού (OCAs) και γενικότερα των εξωγενών παραγόντων, ικανών να μειώσουν τη σκέδαση στους βιολογικούς ιστούς, να ενισχύσουν την αντίθεση της εικόνας και να αυξήσουν το βάθος διείσδυσης της εικόνας, είναι σχετικά πρόσφατη. [29-32]. Τα τελευταία χρόνια, τα OCAs έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό και με επιτυχία για τη μείωση της διασποράς, τόσο σε σταθερά τμήματα ζωικού, όσο και φυτικού ιστού [33], καθώς και σε δείγματα όγκου [34], αποδεικνύοντας τα οφέλη τους στην παροχή βαθύτερης ικανότητας απεικόνισης, για μια μεγάλη ποικιλία οπτικών τεχνικών. Οι τεχνικές αυτές είναι η οπτική τομογραφία συνοχής [31, 35], η μικροσκοπία δεύτερης αρμονικής γενιάς [36], η μικροσκοπία ομοεστιακής ανάκλασης [37, 38, 39], η μικροσκοπίας δύο φωτονίων [40, 41] και η μικροσκοπία φθορισμού [42, 43, 44]. Η μείωση της σκέδασης έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα ισχυρή, κατά την εκτέλεση απεικόνισης σε βάθος ιστού δύο φωτονίων, καθώς έχει

παρατηρηθεί ότι η σκέδαση προκαλεί δραστική μείωση στο βάθος διείσδυσης (σε μικρότερο από αυτό του ισοδύναμου φθορισμού ενός φωτονίου), ενώ αφήνει την ανάλυση σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητη [45, 46].

Από την άλλη πλευρά, η χρήση των OCAs *in vivo* βρίσκεται σε πολύ πιο πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, επειδή οι περισσότεροι από τους παράγοντες που χρησιμοποιούνται συνήθως για σταθερά δείγματα είναι τοξικοί ή χημικά πολύ επιθετικοί. Σε αυτό το σενάριο, έχει προκύψει ανάγκη για βιοσυμβατές εναλλακτικές OCA. Στην παρακάτω Εικόνα 14, περιγράφονται οι εφαρμογές του οπτικού καθαρισμού.



Εικόνα 14 : Εφαρμογές Οπτικού Καθαρισμού

Στις ενότητες που ακολουθούν, παρουσιάζεται μια ιστορική αναδρομή των OCAs και περιγράφονται οι αρχές λειτουργίας των φυσικών μεθόδων, που βασίζονται στην αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης, καθώς και των χημικών μεθόδων, που βασίζονται στον μετασχηματισμό του ιστού. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται συγκεκριμένες εφαρμογές των παραπάνω μεθόδων σε λεπτές τομές ιστού και σε δείγματα όγκου, σε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης του μεγέθους του

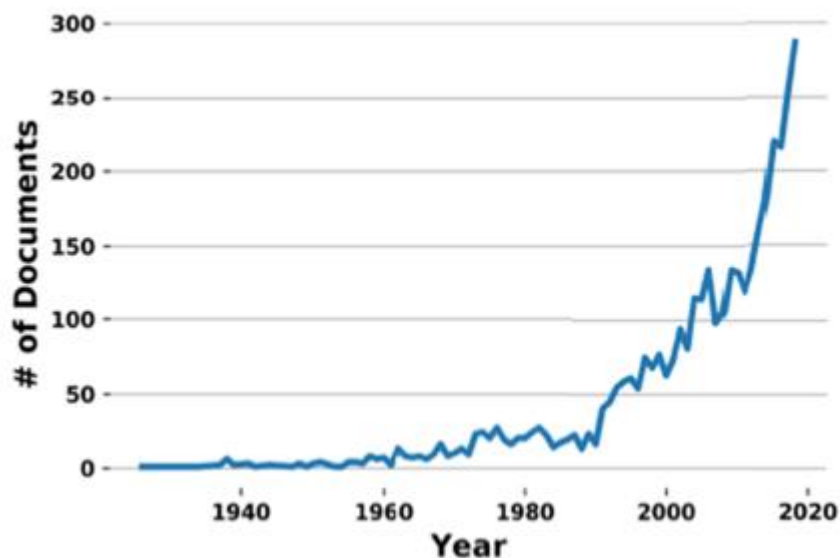
αποτελέσματος, του χρονοδιαγράμματός του, καθώς και διασαφήνισης των μηχανισμών του οπτικού καθαρισμού, αναδεικνύοντας τα επιτεύγματα και τις προκλήσεις αυτής της προσέγγισης.

2.2. Ιστορική Αναδρομή Οπτικού Καθαρισμού Ιστών

Η ιστορία του καθαρισμού των ιστών ξεκινά στις αρχές του 20ου αιώνα με ένα έργο του Spalteholz [49] που εισάγει μια τεχνική, βασισμένη σε οργανικούς διαλύτες για την κάθαρση μεγάλων δειγμάτων ιστού. Η μέθοδος παρουσίασε διάφορους περιορισμούς [50], αλλά παρείχε μια νέα μεθοδολογία για τη μελέτη της ανατομίας.

Ωστόσο, ο καθαρισμός των ιστών δεν έχει εδραιωθεί, πριν ο Tuchin και οι συνάδελφοί του δημοσιεύσουν μια πρωτοποριακή μελέτη στην οποία δοκίμασαν μια σειρά οργανικών και υδατικών χημικών ουσιών, προκειμένου να αυξήσουν τους δείκτες διάθλασης των διαλυμάτων εμβάπτισης και των διαυγών βιολογικών δειγμάτων [30, 51].

Τα επόμενα χρόνια, το ενδιαφέρον για το ερευνητικό πεδίο αυξήθηκε και αρκετές μελέτες εξέτασαν τις επιδράσεις διαφόρων συστατικών στις οπτικές ιδιότητες των βιολογικών υλικών, τόσο σε ιστούς *in vivo*, όσο και σε *ex vivo* [31, 52, 53, 54]. Ωστόσο, το πεδίο άρχισε να αποκτά διαδεδομένο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα από τις αρχές του 21ου αιώνα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Γράφημα Δημοσιευμένων Εργασιών για Καθαρισμό Ιστών κατά τον Πέρασμένο Αιώνα

Οι πρόσφατες εξελίξεις των υδατικών διαλυμάτων από τον Tuchin και τους συνεργάτες, καθώς και η ανάπτυξη τεχνικών μετασχηματισμού ιστών, προκάλεσαν ευρεία εξάπλωση του πεδίου, που προσδιορίστηκε από τις δύο απότομες μεταβολές της κλίσης που εμφανίστηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '90 και το 2013, αντίστοιχα.

Η παραπάνω εξέλιξη συμπίπτει με την αναβίωση της μικροσκοπίας φθορισμού [44] που παρέχει τη δυνατότητα εκτέλεσης απεικόνισης δείγματος μεγάλου όγκου και λήψης της τρισδιάστατης ανακατασκευής της ανατομίας των ιστών. Πράγματι, χάρη στη μικροσκοπία φθορισμού (ειδικά LSM, light sheet microscopy), ο καθαρισμός ιστών άρχισε να εφαρμόζεται όχι μόνο σε λεπτές φέτες, αλλά και σε δείγματα όγκου, όπως όργανα ή ολόκληρους οργανισμούς (π.χ. έμβρυα) [43].

Για να επιτευχθεί υψηλή διαφάνεια ιστού, είναι απαραίτητο να ομογενοποιηθεί ο δείκτης διάθλασης του ιστού με αυτόν του περιβάλλοντος μέσου. Οι βιολογικοί ιστοί χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη διάθλασης (1.50) [55]. Οι οργανικές ενώσεις χαρακτηρίζονται, επίσης, από υψηλούς δείκτες διάθλασης, επομένως ήταν η πρώτη επιλογή για τον καθαρισμό οργάνων, οπότε αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι που βασίζονται σε υδρόφοβες ενώσεις [43] για να επιτευχθεί

πλήρης διαφάνεια του δείγματος. Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτού του είδους των ενώσεων είναι η απόσβεση των φθορίζουσών πρωτεϊνών (π.χ. GFP) που συμβαίνει, ακόμη και με σύντομο χρόνο έκθεσης σε αυτούς τους διαλύτες. Για να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο, δοκιμάστηκαν διαλύματα με βάση το νερό με υψηλό δείκτη διάθλασης, δίνοντας έναυσμα για ανάπτυξη διαφόρων μεθόδων καθαρισμού με βάση υδρόφιλα.

Αυτές οι μεθοδολογίες, αν και διασφαλίζουν τη διατήρηση του φθορισμού, χαρακτηρίζονται από κατώτερη απόδοση καθαρισμού ιστών [56]. Το 2013, μια τεχνική μετασηματισμού ιστού που ονομάζεται CLARITY [57] άνοιξε το δρόμο σε μια νέα προσέγγιση: ο καθαρισμός επιτεύχθηκε με χειρισμό της χημικής δομής του δείγματος. Μια μέθοδος υβριδοποίησης ιστού υδρογέλης ασφαρίζει πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα στις φυσιολογικές τους θέσεις, συνδέοντας ομοιοπολικά τα μόρια με μια υδρογέλη, με βάση το ακρυλικό, ενώ τα λιπίδια απομακρύνονται ομοιόμορφα από τον ιστό. Το δείγμα που προκύπτει χαρακτηρίζεται από χαμηλό δείκτη διάθλασης που μπορεί να συνδυαστεί με επιτυχία με υδατικά διαλύματα ή μείγματα, επιτυγχάνοντας υψηλή διαφάνεια.

2.3. Φυσικές Μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι βασίζονται στη μείωση των οπτικών ανομοιογενειών στο δείγμα, μέσω μιας αναστρέψιμης διαδικασίας που ταιριάζει με τον δείκτη διάθλασης. Αυτό επιτυγχάνεται γενικά χρησιμοποιώντας έναν εξωγενή παράγοντα με δείκτη διάθλασης παρόμοιο με αυτόν των σκεδαστών ιστών.

Από οπτική άποψη, οι βιολογικοί ιστοί μπορούν, σχηματικά, να αναπαρασταθούν ως ένα μεγάλο σύνολο συστατικών με διαφορετικά μεγέθη, σχήματα και δείκτες διάθλασης, που λειτουργούν ως σκεδαστές, βυθισμένοι σε ένα ομοιογενές οπτικό μέσο με το δείκτη διάθλασης του νερού ($n = 1.33$). Τα περισσότερα συστατικά των ιστών όπως κύτταρα, πυρήνες κυττάρων, ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης, έχουν δείκτες διάθλασης στην περιοχή μεταξύ $n = 1.47$ και $n = 1.51$ [55]. Σε αυτή την απλοϊκή απεικόνιση, ένα υγρό με δείκτη διάθλασης στο εύρος των σκεδαστών ιστού, ικανό να διαχέεται μέσα σε ένα δείγμα ιστού και να υποκαθιστά το νερό,

θα μείωνε την οπτική θολότητα και θα επέτρεπε βαθύτερη απεικόνιση. Η αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης δεν είναι η μόνη διαδικασία στη βάση του οπτικού καθαρισμού των ιστών. Στην πραγματικότητα, οι περισσότεροι από τους παράγοντες που χρησιμοποιούνται είναι υπερωσμωτικοί παράγοντες ικανοί να προκαλέσουν αφυδάτωση των ιστών, χάρη στην ασκούμενη υπερωσμωτική πίεση. Η διαδικασία αναστρέψιμης κάθαρσης δεν έχει ακόμη εξηγηθεί πλήρως σε μικροσκοπικό επίπεδο. Η πιο διαδεδομένη υπόθεση [30, 32, 35, 38, 58, 59] βασίζεται στην ωσμωτική πίεση που ασκείται από το υγρό που ταιριάζει με το δείκτη που διαχέεται στο δείγμα ιστού και προκαλεί την επακόλουθη εκροή νερού. Το καθαρό αποτέλεσμα μιας τέτοιας διαδικασίας είναι η αύξηση του δείκτη διάθλασης του υποβάθρου του ιστού με επακόλουθη μείωση της σκέδασης, μέσω μείωσης των κλίσεων του δείκτη διάθλασης μέσα στο δείγμα. Με βάση αυτό, ο παράγοντας καθαρισμού μπορεί να υποκαταστήσει μόρια νερού μέσα στον ιστό, παρέχοντας καλύτερο δείκτη διάθλασης που ταιριάζει με αυτόν του νερού, καθώς οι παράγοντες καθαρισμού έχουν δείκτη διάθλασης στην περιοχή $n = 1.43-1.53$, που προσεγγίζει περισσότερο με αυτόν των συστατικών ιστού ($n = 1.47-1.51$), παρά με αυτόν του νερού ($n = 1.33$). Ως εκ τούτου, οι δύο διεργασίες, αφενός της αντιστοίχισης του δείκτη διάθλασης και αφετέρου της αφυδάτωσης των ιστών, υπό οσμωτική πίεση, συνδέονται στενά. Όλες οι παραπάνω εκτιμήσεις ισχύουν για *ex vivo* ιστούς, ενώ η *in vivo* περιγραφή της διαδικασίας καθαρισμού είναι πολύ πιο περίπλοκη, αφού αρκετές άλλες φυσιολογικές πτυχές πρέπει να ληφθούν υπόψη, συμπεριλαμβανομένης της ομοιόστασης, της φυσιολογικής θερμοκρασίας, των μεταβολικών επιδράσεων των παραγόντων, της κυκλοφορίας του αίματος και άλλων.

2.3.1 Οργανικοί Παράγοντες

Η πρώτη προσπάθεια οπτικού καθαρισμού ενός ιστού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οργανικών διαλυτών που χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη διάθλασης. Ο καθαρισμός, με βάση οργανικούς διαλύτες, αποκτά αξιοσημείωτη διαφάνεια σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (ώρες/ημέρες). Δεδομένου ότι οι βιολογικοί ιστοί αποτελούνται κυρίως από νερό, για να επιτραπεί η βέλτιστη

διάχυση του οργανικού διαλύτη μέσα στο δείγμα, είναι απαραίτητο πρώτα να αφαιρεθεί το νερό από τον ιστό (βήμα αφυδάτωσης) και στη συνέχεια να γίνει η αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης (βήμα καθαρισμού), προκειμένου να επιτευχθεί η τελική διαφάνεια.

Διαφορετικά πρωτόκολλα αναπτύχθηκαν, προσπαθώντας να συνδυάσουν διάφορες λύσεις, για το βήμα αφυδάτωσης και/ή για το βήμα καθαρισμού. Οι πιο κοινές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την αφυδάτωση είναι η αιθανόλη, η μεθανόλη, η τρι-βουτανόλη και το τετραϋδροφουράνιο (THF), ενώ για το βήμα καθαρισμού είναι ο σαλικυλικός μεθυλεστέρας, η βενζυλική αλκοόλη/βενζοϊκός βενζυλεστέρας (BABB), διχλωρομεθάνιο (DCM), η τριτοταγής βουτανόλη και ο διβενζολικός αιθέρας (DBE) [43, 49, 50, 60-66].

Ένα ειδικό χαρακτηριστικό όλων αυτών των μεθόδων είναι η συρρίκνωση του ιστού που προκαλείται από το βήμα της αφυδάτωσης. Πράγματι, η διάχυση του νερού έξω από τον ιστό είναι ταχύτερη από αυτή του αφυδατωμένου διαλύματος που εισέρχεται μέσα στο δείγμα. Μια άλλη ιδιαιτερότητα αυτών των τεχνικών είναι ότι, στο τέλος της διαδικασίας, ο ιστός είναι σκληρός και δύσκολο να κοπεί. Επιπλέον, κατά το στάδιο της αφυδάτωσης, η απομάκρυνση των μορίων του νερού από το δείγμα έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού. Στην πραγματικότητα, η παρουσία νερού είναι συνήθως υποχρεωτική για τη διατήρηση της αναδίπλωσης των ενδογενών φθοριζουσών πρωτεϊνών. Για να ξεπεραστεί αυτό το συγκεκριμένο πρόβλημα οι Schwarz et al. [63] πρότειναν τη χρήση ειδικών λύσεων, για την αύξηση της σταθερότητας των πρωτεϊνών και τη μείωση της μετουσίωσης (denaturation). Μια διαφορετική προσέγγιση συνίσταται στο συνδυασμό του οργανικού καθαρισμού με την ανοσόχρωση (immunostaining) σε ολόκληρο το σώμα (iDISCO) [62], αντί της χρήσης ενδογενών φθοριζουσών πρωτεϊνών. Τέλος, οι διαδικασίες βασίζονται σε επικίνδυνα και διαβρωτικά χημικά που απαιτούν συγκεκριμένες προσεγγίσεις τοποθέτησης και στόχους μικροσκοπίου, για την εκτέλεση της απεικόνισης, εκτός από την ιδιαίτερη προσοχή κατά τον καθαρισμό των ιστών. Πράγματι, ορισμένα από τα προαναφερθέντα διαλύματα είναι τοξικά (π.χ. μεθανόλη) ή μπορούν να σχηματίσουν υπεροξειδία (π.χ. THF, DBE), τα οποία, με ανεπαρκή σταθεροποιητή, μπορεί να εκραγούν, μετά από παρατεταμένη έκθεση σε οξυγόνο ή/και ηλιακό

φως. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να εκτελεσθεί μια συγκεκριμένη διαδικασία για την αφαίρεσή τους [60] και να χρησιμοποιηθούν τα διαλύματα κάτω από απαγωγέα καπνού (για παράδειγμα, τήξη της τέτρα-βουτανόλης πριν από τη χρήση [66]).

2.3.2. Υδατικοί Παράγοντες

Αναπτύχθηκαν μέθοδοι καθαρισμού που βασίζονται σε υδατικούς παράγοντες, για να προσπαθήσουν να διατηρήσουν τον ενδογενή φθορισμό και τη δομή των ιστών. Η ιδέα της χρήσης υδατικών διαλυμάτων για τον καθαρισμό των ιστών προέκυψε από την παρατήρηση ότι η εμβάπτιση δείγματος ιστού σε διάλυμα γλυκερίνης και νερού (80% γλυκερίνη, $n = 1.44$), οδήγησε στον καθαρισμό του δείγματος. Αυτή η κάθαρση, οφείλεται στη μείωση της αναντιστοιχίας του δείκτη διάθλασης μεταξύ των συστατικών των ιστών και των ενδιάμεσων υγρών που προκαλείται από το διάλυμα. Στην πραγματικότητα, το πιο άφθονο συστατικό ιστού (δηλ. το κολλαγόνο) έχει δείκτη διάθλασης ομάδας στην περιοχή 1.43 – 1.53, ανάλογα με την ενυδάτωση [67], και η γλυκερίνη έχει δείκτη διάθλασης φάσης 1.47 [31]. Ξεκινώντας από αυτή την παρατήρηση, διάφορες εργασίες χρησιμοποίησαν τη γλυκερίνη, μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις, για να πραγματοποιήσουν καθαρισμό λεπτών ιστών [31, 51, 54, 68-71].

Άλλες προσεγγίσεις χρησιμοποίησαν διαλύματα κορεσμένων σακχάρων, όπως σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη (SeeDB, $n = 1.48$) [31, 51, 53, 72, 73], τα οποία όμως, εμφανίζουν ως μειονέκτημα ένα υψηλό ιξώδες. Το υψηλό ιξώδες γενικά συνεπάγεται μια αργή διάχυση του παράγοντα καθαρισμού μέσα στο δείγμα, έχοντας αρνητικό αντίκτυπο στην ταχύτητα της διαδικασίας καθαρισμού και περιορίζοντας τις δυνατότητες εφαρμογής στον καθαρισμό δειγμάτων όγκου. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, έχουν προταθεί εναλλακτικές προσεγγίσεις, βασισμένες σε υδατοδιαλυτές ενώσεις όπως η 2,2-θειοδιαιθανόλη (TDE) [74, 75, 76].

Μια άλλη στρατηγική, που εισήχθη το 2011 από τους Hama et al [77], χρησιμοποίησε μια υπερυδατωμένη ένωση για να μειώσει τη σκέδαση του φωτός. Με την παράξενη παρατήρηση ότι η ουρία 4 M κάνει διαφανείς τις μεμβράνες

φθοριούχου πολυβινυλιδενίου, εισήγαγαν το πρωτόκολλο Scale. Η χαρακτηριστική πτυχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα της ουρίας να εισέρχεται σε σφιχτά διπλωμένες περιοχές πρωτεϊνών υψηλού δείκτη διάθλασης, δημιουργώντας μια οσμωτική βαθμίδα που ωθεί προς τα έξω το νερό. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, οι πρωτεΐνες μερικώς μετουσιώνονται αλλά και ενυδατώνονται, οδηγώντας σε συνολική μείωση του δείκτη διάθλασης του ιστού. Ακολουθώντας αυτή την προσέγγιση, προτάθηκαν διάφορες μέθοδοι (ClearT, ClearT2, PEGASOS, RTF) [78, 79, 80]. Οι υπερωσμωτικοί παράγοντες, όπως η προπυλενογλυκόλη και το οξικό οξύ, έχουν αναφερθεί ότι αυξάνουν το βάθος απεικόνισης στην οπτική τομογραφία συνοχής [31, 35], στη μικροσκοπία δεύτερης αρμονικής γενιάς [36, 81], στη μικροσκοπία ομοεστιακής ανάκλασης [37, 38] και στη μικροσκοπία δύο φωτονίων [40].

Παρόλο που όλες αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν τη διατήρηση του φθορισμού, προκαλούν επίσης μαζική διόγκωση και αλλοίωση των ιστών. Επιπλέον, η διαφάνεια επιτυγχάνεται μόνο σε φέτες ιστού ή στον εγκέφαλο νεογέννητων ποντικών, αλλά όχι σε ολόκληρο τον εγκέφαλο ενηλίκων ποντικών ή σε δείγματα όγκου.

Ως συμβιβασμός μεταξύ υπερ-ενυδάτωσης και κορεσμένων διαλυμάτων σακχάρων, μελετήθηκαν άλλα πρωτόκολλα. Η μέθοδος CUBIC [82] χρησιμοποιεί έναν μηχανισμό με βάση την ουρία υπερ-ενυδάτωσης, αλλά περιλαμβάνει ένα διάλυμα σακχαρόζης υψηλού δείκτη διάθλασης στη διαδικασία καθαρισμού. Ωστόσο, για την αφαίρεση λιπιδίων και τη λήψη διαφανών δειγμάτων, χρησιμοποιεί επίσης πολύ υψηλά επίπεδα Triton (50%), με αποτέλεσμα την απώλεια πρωτεΐνης (24%-41%), η οποία μειώνει τις τοπικές συγκεντρώσεις των και αποδυναμώνει την πιθανή ανοσόχρωση. Η ίδια προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε στην τεχνική FRUIT [83], που συνδυάζει τις τεχνικές SeeDB και Scale, αναμειγνύοντας ουρία με φρουκτόζη, και με τη μέθοδο ScaleS [84] που χρησιμοποιεί ουρία και σορβιτόλη.

Γενικά, οι υδατικές τεχνικές βελτιώνουν τη διατήρηση του φθορισμού των πρωτεϊνών και δεν είναι τοξικές, αλλά δεν καθαρίζουν τον ιστό όπως οι οργανικές μέθοδοι, περιορίζοντας έτσι την ποιότητα των λαμβανόμενων εικόνων.

2.4. Χημικές Μέθοδοι

4.1 Μετασχηματισμός Ιστού

Οι βιολογικοί ιστοί αποτελούνται από διαφορετικά είδη μορίων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία λιπιδίων-υδατικών διεπιφανειών, που συμβάλλουν στη δημιουργία ετερογενειών του δείκτη διάθλασης στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα τα οποία, με τη σειρά τους, οδηγούν σε σκέδαση φωτός. Επιπλέον, οι κυτταρικές μεμβράνες δημιουργούν ένα φυσικό φράγμα διάχυσης που καθιστά τους ιστούς ελάχιστα προσβάσιμους στα μακρομόρια. Ξεκινώντας από αυτές τις παρατηρήσεις, το 2013 αναπτύχθηκε μια νέα προσέγγιση κάθαρσης, που βασίζεται στον χημικό μετασχηματισμό του δείγματος: η μέθοδος CLARITY [57]. Η βασική ιδέα, πίσω από αυτήν την τεχνική, είναι να αποκτηθεί ένα σκεύασμα που υποστηρίζει φυσικά τον ιστό, χωρίς τη δομική συμβολή των λιπιδίων. Η αφαίρεση των διπλών στοιβάδων των λιπιδίων των κυττάρων επιτρέπει στο φως και στα μακρομόρια να διεισδύσουν βαθιά στον ιστό, επιτρέποντας την τρισδιάστατη απεικόνιση και την ανοσοϊστολογική ανάλυση δειγμάτων μεγάλου όγκου. Για να παρέχει δομική ακεραιότητα και διατήρηση των βιομορίων, η CLARITY ενσωματώνει το δείγμα σε μια νανοπορώδη υδρογέλη ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου. Είναι σημαντικό, ότι τα λιπίδια και τα βιομόρια που δεν έχουν λειτουργικές ομάδες για σύζευξη παραμένουν αδέσμευτα. Στη συνέχεια, τα λιπίδια αφαιρούνται εφαρμόζοντας ένα ηλεκτρικό πεδίο σε συνδυασμό με ένα ισχυρό απορρυπαντικό που βασίζεται σε SDS (οι συγγραφείς ονομάζουν αυτή τη μέθοδο ETC: ηλεκτροφορητικός καθαρισμός ιστών). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, υπάρχει συνολική απώλεια πρωτεΐνης περίπου 8% [57]. Παρόλο που δεν έχει εξακριβωθεί το ποιες πρωτεΐνες είναι πιο ευαίσθητες στη θεραπεία, είναι λογικό να υποτεθεί ότι οι πρωτεΐνες μεμβράνης παραμένουν αποσπασμένες από την υδρογέλη και απομακρύνονται ή καταστρέφονται. Ωστόσο, η προκύπτουσα υδρογέλη είναι εξαιρετικά διαφανής, συμβατή με φθορισμό και διαπερατή στα μακρομόρια. Χωρίς κυτταρικές μεμβράνες, τα αντισώματα μπορούν εύκολα να διεισδύσουν βαθιά στον ιστό, επιτρέποντας την απεικόνιση μεγάλων όγκων. Επιπλέον, ο συνολικός ιστός χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο δείκτη διάθλασης που μπορεί να συνδυαστεί με υδατικά διαλύματα

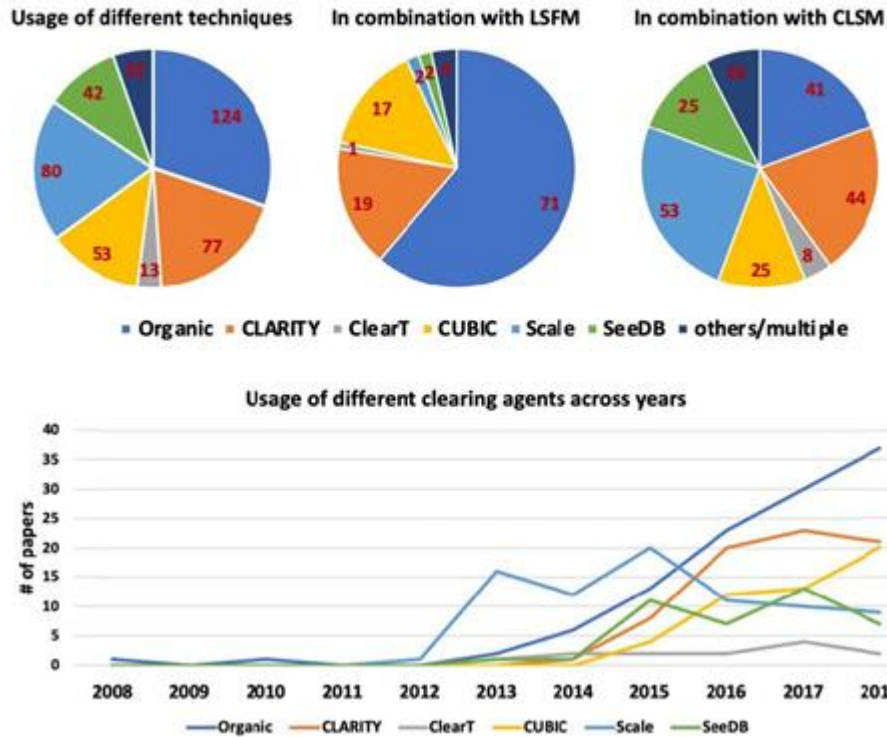
που είναι ευκολότερα στον χειρισμό, λιγότερο τοξικά και πιο βιοσυμβατά (διατηρούνται τα ενδογενή σήματα φθορισμού).

2.5. Εφαρμογές Μεθόδων Οπτικού Καθαρισμού

Η μεγάλη και ποικίλη πληθώρα μεθόδων κάθαρσης, που δημοσιεύονται τα τελευταία χρόνια, καθιστά πολύ δύσκολο για κάποιον, που προσεγγίζει το ερευνητικό πεδίο, να αποφασίσει ποια είναι η καλύτερη τεχνολογία για χρήση. Είναι, λοιπόν, χρήσιμο να γίνει μια προσπάθεια, να αναλυθεί η χρήση των κύριων προσεγγίσεων κάθαρσης, εστιάζοντας στην εφαρμογή και τη διάδοσή τους στην επιστημονική κοινότητα.

Μια σημαντική διάκριση βασίζεται στη δυνατότητα καθαρισμού λεπτών δειγμάτων ή δειγμάτων μεγάλου όγκου. Οι πρώτες μέθοδοι καθαρισμού εφαρμόστηκαν σε δείγματα μεγέθους mm. Παρόλο που ήταν μια μεγάλη καινοτομία εκείνη την εποχή, οι τωρινές μέθοδοι καθαρισμού τελευταίας τεχνολογίας επιτρέπουν τον καθαρισμό δειγμάτων μεγάλου όγκου (μέγεθος cm).

Μια αντικειμενική ανάλυση της δυνατότητας εφαρμογής των διαφόρων μεθόδων κάθαρσης, που δημοσιεύθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες, έγινε αναλύοντας τη βιβλιογραφία. Για κάθε άρθρο, σχολιάστηκε η διαύγαση που χρησιμοποιήθηκε, το δείγμα που αναλύθηκε (και εάν απεικονίστηκε πλήρως ή όχι), η μέθοδος απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε και η ανάλυση των δεδομένων που εμφανίζονται. Εντοπίστηκαν 410 εργασίες, που δημοσιεύτηκαν από το 2008 και ανέφεραν τη χρήση μεθόδων κάθαρσης για βιολογικές εφαρμογές. Η βιβλιογραφική ανάλυση δείχνει ότι ορισμένες από τις προσεγγίσεις κάθαρσης είναι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες σε σύγκριση με άλλες. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρεται στα Διαγράμματα 3,4, οι μέθοδοι της DISCO έχουν τη μεγαλύτερη επιτυχία μεταξύ όλων των μεθοδολογιών.



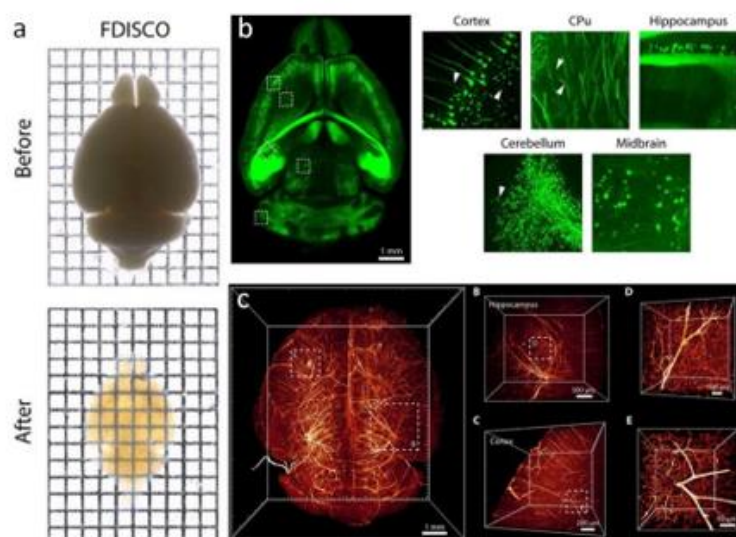
Διαγράμματα 4,5 : [Επάνω] Μεθόδοι Καθαρισμού για Βιολογικές Εφαρμογές [Κάτω] Χρονοδιάγραμμα Χρήσης Τεχνικών Καθαρισμού για Βιολογικές Εφαρμογές [134]

Τα παραπάνω γραφήματα πίτας δείχνουν τη χρήση μεθόδων καθαρισμού σε συνδυασμό με μικροσκοπία φθορισμού και μικροσκοπία σάρωσης ομοεστιακής σάρωσης λέιζερ, αντίστοιχα.

Πράγματι, αυτό το πρωτόκολλο, που βασίζεται σε οργανικούς παράγοντες, είναι πολύ εύκολο να εκτελεστεί εξαιρετικά γρήγορα και επιτρέπει την επίτευξη καλής διαφάνειας (Διαγράμματα 4,5). Από την πρώτη, κίολας, δημοσίευση, η δυνατότητα εφαρμογής της μεθοδολογίας εξαπλώθηκε, χάρη στην ανάπτυξη ειδικών οπτικών διορθώσεων, ώστε να ταιριάζει με τον δείκτη διάθλασης που χρησιμοποιείται στις μεθοδολογίες που είναι συμβατές με την επικίνδυνη ουσία που χρησιμοποιείται κατά την κάθαρση. Επιπλέον, ο υψηλός RI, που επιτυγχάνεται με αυτές τις μεθοδολογίες, επέτρεψε την εφαρμογή της μεθόδου καθαρισμού σε διάφορα δείγματα που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές

συνθέσεις: για παράδειγμα, όργανα όπως καρδιά, ήπαρ, νεφρός, πάγκρεας, πνεύμονας, δέρμα, λεμφαδένες και ολόκληρα έμβρυα.

Ωστόσο, η ενδογενής απόσβεση του φθορισμού που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραμένει ένας περιορισμός. Μόνο δείγματα πολύ υψηλού φθορισμού μπορούν να καθαριστούν με αυτήν την τεχνική [47,48]. Η εναλλακτική της χρήσης αντισωμάτων (παρουσιάζεται στο iDISCO) είναι μια μερική λύση, καθώς ο ανοσοφθορισμός απαιτεί μεγαλύτερα πρωτόκολλα και είναι πολύ ακριβός.



Εικόνα 15: Εγκέφαλοι Ποντικού Πριν και Μετά τον Καθαρισμό

Στην Εικόνα 15 (a) φαίνεται ολόκληρος ο εγκέφαλος του ποντικίου πριν και μετά την εκκαθάριση του με FDISCO. Στην Εικόνα 15 (b) παρουσιάζονται εικόνες εγκέφαλου ποντικίου Thy1-GFP-M με ένθετα σε υψηλή ανάλυση. Τέλος στην Εικόνα 15 (c) φαίνεται η τρισδιάστατη απεικόνιση της αγγείωσης στον εγκέφαλο ποντικίου επισημασμένη με ένεση αντισώματος CD31 -A647. Qi et al [71].

Η δεύτερη πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος καθαρισμού στην απεικόνιση μεγάλης κλίμακας είναι η τεχνική μετασχηματισμού CLARITY (με όλες τις παραλλαγές της).

Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 3,4, το DISCO και το CLARITY είναι τα πιο χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα καθαρισμού, για απεικόνιση μεγάλης κλίμακας με μικροσκοπία φθορισμού. Ωστόσο, δεν είναι οι τυπικές τεχνικές για τη μελέτη της τρισδιάστατης οργάνωσης του δείγματος. Πράγματι, οι περισσότερες από τις προηγουμένως περιγραφείσες μεθοδολογίες καθαρισμού έχουν χρησιμοποιηθεί για βιολογικές εφαρμογές, σε μικρότερο δείγμα σε συνδυασμό με ομοεστιακή και όχι με LSM.

Η έλλειψη μιας μοναδικής μεθοδολογίας υπογραμμίζει το γεγονός ότι, ακόμη και αν η αποτελεσματικότητα της κάθαρσης έχει βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, εξακολουθούμε να μην έχουμε μια τυπική μέθοδο αναφοράς, που να πείθει ολόκληρη την επιστημονική κοινότητα. Μια τέτοια μέθοδος αναφοράς, θα βελτιώσει όχι μόνο τη μελέτη *ex vivo* δειγμάτων, αλλά και τη δυνατότητα διεύρυνσης της εφαρμογής μεθόδων καθαρισμού για ανάλυση *in vivo*. Πράγματι, τα πρωτόκολλα καθαρισμού χρησιμοποιούνται ευρέως για σταθερούς ιστούς, αλλά βρίσκονται ακόμη σε αρχικό στάδιο όσον αφορά την *in vivo* ανάλυση.

2.6. Καθαρισμός Ιστού *In Vivo*

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι οπτικοί παράγοντες καθαρισμού έχουν διερευνηθεί σε βάθος και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό για τον καθαρισμό ιστών, επιτρέποντας βαθύτερη διείσδυση φωτός σε οπτικά θολά μέσα. Κατά τη μετάβαση από *ex vivo* σε *in vivo* καθαρισμό ιστού, πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφορα ζητήματα. Ειδικότερα, τα θέματα ασφάλειας και βιοσυμβατότητας περιορίζουν δραστηρικά το εύρος των μεθόδων κάθαρσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν *in vivo* στους ανθρώπους. Βασικά, το σύνολο των παραγόντων που είναι κατάλληλοι για αυτόν τον σκοπό είναι περιορισμένο σε σχέση με αυτά που περιγράφονται στο τμήμα υδατικών μεθόδων. Στην πραγματικότητα, η ανάγκη μιας αναστρέψιμης διαδικασίας καθαρισμού περιορίζει την επιλογή σε υδατικά διαλύματα γλυκερίνης, σακχάρων, πολυαιθυλενογλυκόλης, προπυλενογλυκόλης ή οξικού οξέος, αποκλείοντας οποιαδήποτε άλλη ένωση λόγω τοξικότητας και/ή χημικής επιθετικότητας.

Μόνο μερικά παραδείγματα *in vivo* οπτικού καθαρισμού μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία, τα περισσότερα από τα οποία στοχεύουν το δέρμα [68, 81, 85-91]. Ο στόχος είναι η παροχή καθαρισμού του δέρματος για οπτική πρόσβαση στη δερματική δομή και συστατικά όπως τα αιμοφόρα αγγεία, οι αδένες και άλλα. Για τον οπτικό καθαρισμό του δέρματος, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτός ο ιστός αποτελείται βασικά από δύο ξεχωριστά στρώματα: μια υπερκείμενη επιδερμίδα που περιέχει κύτταρα και ενδιάμεσα υγρά και ένα υποκείμενο χόριο που αποτελείται από ένα δίκτυο κολλαγόνου και ελαστικών ινών, γεμάτο με υαλουρονικό οξύ και γλυκοζαμινογλυκάνες. Λαμβάνοντας υπόψη τη συγκεκριμένη μορφολογία και τη σύνθεση αυτών των δύο δερματικών διαμερισμάτων, ο μηχανισμός της διαδικασίας καθαρισμού και η αποτελεσματικότητα αναμένεται να είναι διαφορετικές, λόγω των επιδράσεων που οφείλονται στην ομοιόσταση και στις διακυμάνσεις της οσμωτικής πίεσης στα ζωντανά κύτταρα [92].

Όταν εξετάζουμε την επιδερμίδα, το πρώτο εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί είναι η κεράτινη στιβάδα (SC), ένα λεπτό (10-20 microns) στρώμα νεκρών κερατινοποιημένων κυττάρων που σχηματίζει ένα αδιάβροχο φράγμα που εμποδίζει τη διείσδυση εξωγενών παραγόντων στο δέρμα. Η υπέρβαση του φραγμού SC επιτρέπει στο καθαριστικό να διεισδύσει σε όλη την επιδερμίδα μέσω του ενδιάμεσου χώρου μεταξύ των κυττάρων και να διαχέεται προς τα κάτω στο χόριο. Η διείσδυση του παράγοντα μέσα στα κύτταρα εμποδίζεται από τις κυτταρικές μεμβράνες, των οποίων οι πόροι θα μπορούσαν τελικά να ανοίξουν χάρη στην ηλεκτροδιάτρηση [93-97]. Ωστόσο, μια τέτοια προσέγγιση απαιτεί πολύ έντονα τοπικά ηλεκτρικά πεδία, που μπορούν να εφαρμοστούν μόνο σε μια πολύ μικρή περιοχή, πιέζοντας το δέρμα μεταξύ δύο ηλεκτροδίων και εφαρμόζοντας ένα περιοδικά παλμικό ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροδιάτρηση επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο συντονισμό των ιδιοτήτων του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται στον ιστό ως προς το εύρος του ηλεκτρικού πεδίου, τη συχνότητα παλμού και τον κύκλο λειτουργίας [98, 99, 100].

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η επιδερμίδα έχει πάχος περίπου 50-150 μm , σε σύγκριση με πάχος χόριου περίπου 1-5 mm, η στόχευση του δέρματος είναι πιο κατάλληλη για τη λήψη συνολικής οπτικής κάθαρσης ιστού για τρεις λόγους: i) το

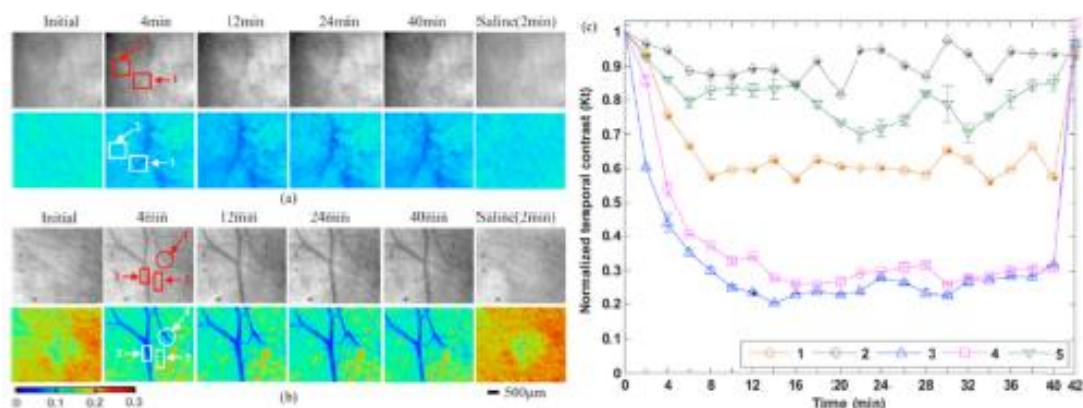
χόριο αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% ολόκληρου του πάχους του δέρματος, ii) η αναντιστοιχία του δείκτη διάθλασης μεταξύ του διάμεσου υγρού και των δερματικών συστατικών είναι υψηλή, προκαλώντας υψηλή σκέδαση στο χόριο, iii) η διείδυση εξωγενών παραγόντων μέσα στο χόριο είναι ευκολότερη, λόγω των μεγαλύτερων διαμέσων διαστημάτων σε σύγκριση με εκείνα της επιδερμίδας.

Η οπτική κάθαρση του δέρματος συνίσταται βασικά στην αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης των ινών κολλαγόνου, που αντιπροσωπεύουν το πιο άφθονο δερματικό συστατικό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια υδατικών διαλυμάτων γλυκερίνης, σακχάρων ή προπυλενογλυκόλης σε χαμηλή συγκέντρωση. Η αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης είναι εγγυημένη από το γεγονός ότι το πιο άφθονο δερματικό συστατικό (δηλαδή το κολλαγόνο) έχει δείκτη διάθλασης 1.47 [31], η γλυκόζη 1.46 [30] και η προπυλενογλυκόλη 1.43 [101]. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το επίπεδο ενυδάτωσης του δερματικού κολλαγόνου είναι άγνωστο, είναι δύσκολο να καθοριστεί ποιος είναι ο παράγοντας που παρέχει τον καλύτερο δείκτη διάθλασης που ταιριάζει με αυτόν του κολλαγόνου.

Μια πιο λεπτομερής εξήγηση της διαδικασίας καθαρισμού σε μικροσκοπικό επίπεδο δεν έχει παρασχεθεί ακόμη, έστω κι αν ορισμένες πτυχές έχουν ήδη διευκρινιστεί για τη γλυκερίνη [59,81], η οποία είναι η καλύτερη υποψήφια για *in vivo* οπτική κάθαρση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αναστρέψιμη διάσπαση του κολλαγόνου παρουσία γλυκερίνης [36,102]. Περαιτέρω μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε παρασκευάσματα κολλαγόνου και στόχευαν στην επαλήθευση της διαλυτότητας του κολλαγόνου και του οπτικού καθαρισμού [103, 104, 105], επιβεβαίωσαν ότι η διάσταση του κολλαγόνου παίζει σημαντικό ρόλο στην οπτική κάθαρση. Στη μελέτη που διεξήχθη από τον Wen και τους συνεργάτες του [81], χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο SHG και δεν παρατηρήθηκε διάσπαση κολλαγόνου ή διόγκωση ιστού μετά την έγχυση γλυκερίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι συγγραφείς παρατήρησαν μόνο σημαντικά μικρότερες ίνες κολλαγόνου, όταν χρησιμοποιούσαν διάλυμα γλυκερίνης 75%, πιθανότατα λόγω αφυδάτωσης των ιστών. Ο Samatham και οι συνεργάτες του [106] παρατήρησαν μια σημαντική διακύμανση του παράγοντα ανισοτροπίας

σκέδασης g , με ελάχιστη διακύμανση του συντελεστή σκέδασης, κατά την εφαρμογή της γλυκερίνης στο δέρμα του ποντικού.

Ο Tuchin και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι ο κύριος μηχανισμός του οπτικού καθαρισμού του δέρματος είναι η αντιστοίχιση του δείκτη διάθλασης που προκαλείται από τη διάχυση των OCAs στον ιστό και τη ροή του νερού έξω από τον ιστό, καθώς και από τη διάταξη των ινιδίων του ιστού με πιο τακτικό τρόπο [30, 81]. Οι επιδράσεις της γλυκερίνης έχουν επίσης αποδειχθεί ότι είναι μερικά αναστρέψιμες [31, 36, 40], παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωση [81]. Κατά τη χρήση βιοσυμβατών παραγόντων *in vivo*, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται, όχι μόνο λόγω της αναστρεψιμότητας, αλλά ιδιαίτερα λαμβάνοντας υπόψη ότι αυτοί οι παράγοντες μπορεί να έχουν παρενέργειες στους ιστούς, όταν χρησιμοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στην πραγματικότητα, για τη γλυκερίνη, έχει αποδειχθεί ότι μια συγκέντρωση άνω του 30% στο νερό προκαλεί οίδημα και άλλες ανεπιθύμητες παρενέργειες όταν εφαρμόζεται *in vivo* για καθαρισμό του δέρματος του ποντικού [107]. Ως εκ τούτου, μια αντιστάθμιση μεταξύ πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων όσον αφορά την αποτελεσματικότητα καθαρισμού, την ταχύτητα λειτουργίας, την αναστρεψιμότητα και τις παρενέργειες πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα γλυκερίνης για οπτικό καθαρισμό δέρματος *in vivo*. Όσον αφορά τα διαλύματα προπυλενογλυκόλης και σακχάρων, οι ακριβείς τρόποι λειτουργίας δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως.



Εικόνα 16: Διαδερμική Απεικόνιση της Κυκλοφορίας του Αίματος Μέσω Οπτικά Καθαρού Δέρματος με Χρήση Λέιζερ Απεικόνισης Κηλίδων Αντίθεσης (LSCI)

Το LSCI παρέχει χαμηλή ή υψηλή αντίθεση ανάλογα με το αν τα εικονιζόμενα σκεδαζόμενα είναι κινούμενα ή ακίνητα. Ο οπτικός καθαρισμός ελήφθη, χρησιμοποιώντας τοπική εφαρμογή πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-400), μόνη της ή σε συνδυασμό με 10% θειαζόνη ως χημικό ενισχυτή. Zhu et al. [87].

Σε αυτό το πλαίσιο, η διείσδυση του παράγοντα μέσα στο χόριο του δέρματος θα μπορούσε να επιτευχθεί με την υπέρβαση του φραγμού SC, ο οποίος εμποδίζει ή περιορίζει τη διαδερμική διάχυση της διείσδυσης του οπτικού καθαριστικού παράγοντα που αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε. Οι φυσικές μέθοδοι είναι γενικά ασφαλείς και βασίζονται στην ολική ή μερική αφαίρεση του SC μέσω μεθόδων που βασίζονται σε διαδικασία τριψίματος με γυαλόχαρτο [108], επαναλαμβανόμενη απογύμνωση ταινίας [109], υπέρηχο [110], διάτρηση με μικροβελόνα [111] και ηλεκτροδιάτρηση [112, 113, 114, 115]. Η οπτική προσέγγιση διερευνήθηκε επίσης, συμπεριλαμβανομένου του φωτισμού με λάμπα φλας [69] ή λέιζερ 1064 nm [91]. Οι χημικές μέθοδοι βασίζονται στη χρήση χημικών ενισχυτών όπως αλκοόλη, προπυλενογλυκόλη (PG), αζόνη, θειαζόνη, διμεθυλοσουλφοξείδιο, λιπαρά οξέα και ελαϊκό οξύ [87, 116, 117, 118].

Μεταξύ αυτών των χημικών ενισχυτών, η θειαζόνη βρέθηκε να είναι ένας πολύ καλός χημικός ενισχυτής για *in vivo* οπτικό καθαρισμό του δέρματος όταν χρησιμοποιείται είτε μόνη της [52] είτε σε συνδυασμό με πολυαιθυλενογλυκόλη [119] (Εικόνα 18), χωρίς να προκαλεί καμία σημαντική ιστοπαθολογική ή μικροδομικές αλλαγές στον επεξεργασμένο ιστό δέρματος. Μια πρόσφατη μέθοδος, που προτάθηκε από τους Shi et al [109] βασίζεται στον συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων σε μια υβριδική προσέγγιση που αποτελείται από τη χρήση ενός χημικού ενισχυτή μετά από πολλαπλή αφαίρεση ταινίας.

Με αυτόν τον τρόπο, το SC αφαιρείται μερικώς με τη φυσική μέθοδο, επιτρέποντας την καλύτερη αποτελεσματικότητα του χημικού ενισχυτή. Αν και πολλές μέθοδοι που στοχεύουν στην υπέρβαση του φραγμού SC έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα, καμία από αυτές δεν έχει ακόμη καταλήξει σε ένα παγκοσμίως αποδεκτό πρότυπο. Πρέπει ακόμη να γίνει μεγάλη προσπάθεια, όσον αφορά την τυποποίηση, τόσο των χρησιμοποιημένων παραγόντων, όσο και των

πρωτοκόλλων χορήγησης προτού η *in vivo* οπτική κάθαρση μπορεί να γίνει μια διαδικασία που χρησιμοποιείται σε κλινικό επίπεδο.

Από την εμφάνισή του στις αρχές του 20ου αιώνα, ο οπτικός καθαρισμός έχει υποστεί αρκετές βελτιώσεις χάρη σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν, καθεμία με διαφορετικές παραλλαγές και τρόπους εφαρμογής. Ωστόσο, ένα παγκοσμίως αναγνωρισμένο πρότυπο απέχει ακόμη πολύ από τον καθορισμό και την αποδοχή, ειδικά αν ληφθεί υπόψη ότι η δυναμική της διαδικασίας καθαρισμού είναι διαφορετική σε κάθε ιστό, καθώς επηρεάζεται από τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του ίδιου του ιστού. Στην παρούσα εργασία, αναφερθήκαμε σε όλες τις αναπτυγμένες μεθόδους οπτικού καθαρισμού, προσπαθώντας να τις περιγράψουμε σε μια ιστορική προοπτική και να τις ομαδοποιήσουμε με βάση τη δράση που έχουν σε βιολογικούς ιστούς και δείγματα. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διακριτές προσεγγίσεις, ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή, ειδικά όταν εξετάζεται η κάθαρση δειγμάτων λεπτού ιστού, μαζικών δειγμάτων ή ζώντων ζώων/ατόμων. Ειδικότερα, κατά την επιλογή της καταλληλότερης προσέγγισης για το δείγμα που πρόκειται να καθαριστεί, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η αντιστάθμιση μεταξύ της αποτελεσματικότητας καθαρισμού, της ταχύτητας της διαδικασίας, της χημικής επιθετικότητας, της αναστρεψιμότητας, της ενδογενούς διατήρησης του φθορισμού, της ικανότητας ανοσοχρώσης και των πιθανών παρενεργειών για εφαρμογές *in vivo*, που χαρακτηρίζουν κάθε προσέγγιση.

Ο μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων που εκμεταλλεύονται την *ex vivo* κάθαρση ιστών για την εκτέλεση τρισδιάστατης αρχιτεκτονικής ανακατασκευής μεγάλων δειγμάτων τόσο για ανατομική όσο και για παθολογική ανάλυση υπογραμμίζει την υψηλή δυνατότητα αυτού του θέματος. Ωστόσο, ο μεγάλος αριθμός μεθόδων που αναπτύχθηκαν επισημαίνει επίσης το γεγονός ότι μια μοναδική τεχνική για αυτήν την ανάλυση εξακολουθεί να λείπει. Προτάθηκαν διάφορες προσαρμογές των πρωτοκόλλων ανάλογα με τον τύπο του δείγματος, την τεχνολογία λήψης απεικόνισης ή την επισήμανση ιστού. Αυτό οδηγεί σε κάθε εργαστήριο να χρησιμοποιεί τη δική του μεθοδολογία, αποτρέποντας έτσι την τυποποίηση της διαδικασίας και των αποτελεσμάτων. Μέχρι σήμερα, δεν είναι ακόμα δυνατό να ισχυριστεί κανείς ότι μια διαδικασία είναι καλύτερη από άλλες, καθώς όλες οι

μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι τώρα χαρακτηρίζονται από πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Για μια αξιόπιστη ανάλυση ρουτίνας εξακολουθεί να λείπει ένα ισχυρό πρωτόκολλο συμβατό με όλους τους διαφορετικούς τύπους τεχνικών επισήμανσης και απεικόνισης ιστών. Μόνο ένα τέτοιο πρωτόκολλο θα επέτρεπε την τελική τυποποίηση των εφαρμογών *ex vivo* μεθόδων καθαρισμού ιστών.

Για *in vivo* εφαρμογή, η αποτελεσματικότητα καθαρισμού εξαρτάται από τον παράγοντα που χρησιμοποιείται καθώς και από τη συγκέντρωσή του, οδηγώντας γενικά σε πιο αποτελεσματική κάθαρση καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του παράγοντα. Στην πραγματικότητα, τόσο η αποτελεσματικότητα καθαρισμού όσο και η ταχύτητα επηρεάζονται έντονα από τη συμπεριφορά διάχυσης του παράγοντα εντός του ιστού που πρόκειται να καθαριστεί, με ταχύτερο και αποτελεσματικότερο καθαρισμό καθώς μειώνεται ο χρόνος διάχυσης του παράγοντα. Σε αυτό το σενάριο, η χρήση χημικών ενισχυτών ικανών να διευκολύνουν τη διάχυση του παράγοντα σε βαθύ ιστό έχει αποδειχθεί ότι είναι κλειδί για την επιτυχία για μια αποτελεσματική οπτική κάθαρση *in vivo* σε εύλογο χρονικό διάστημα. Ένα καλό παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός PEG-400 και θειαζόνης, ο οποίος παρέχει ταχύτερη και πιο αποτελεσματική κάθαρση του δέρματος *in vivo* σε σχέση με τη χορήγηση μόνο του PEG-400. Ειδικότερα, ακόμη και αν το τελευταίο μπορεί κατ' αρχήν να παρέχει καλύτερο ταίριασμα με δείκτη διάθλασης για το χόριο του δέρματος, ο μεγάλος χρόνος διάχυσης προκαλεί καθαριστικό αποτέλεσμα ανεπαρκές για την παρακολούθηση της δερματικής ροής αίματος μέσω του ανέπαφου δέρματος ποντικού, εκτός εάν χορηγείται παράλληλα με έναν χημικό ενισχυτή, όπως η θειαζόνη. Άλλα χαρακτηριστικά, όπως η χημική επιθετικότητα, η αναστρεψιμότητα και οι παρενέργειες πρέπει να ληφθούν υπόψη με ιδιαίτερη προσοχή, ειδικά για εφαρμογές *in vivo*, ενώ αυτά είναι λιγότερο σημαντικά σε εφαρμογές *ex vivo*. Ωστόσο, είναι δύσκολο να περιγραφούν τα κίνητρα για την επιλογή μιας προσέγγισης αντί για μία άλλη κατά την εφαρμογή καθαριστικών παραγόντων *in vivo*, καθώς η διαδικασία καθαρισμού έχει αποσαφηνιστεί εν μέρει σε μικροσκοπική και μοριακή κλίμακα μόνο *ex vivo*. Οι μηχανισμοί για *in vivo* οπτικό καθαρισμό, από την άλλη πλευρά, απέχουν ακόμη πολύ από το να είναι καλά κατανοητοί, λαμβάνοντας υπόψη την

κύρια φυσιολογική πολυπλοκότητα σε σχέση με την *ex vivo* συνθήκη. Εν πάση περιπτώσει, λίγες εμπειρικές υποδείξεις θα μπορούσαν να παρασχεθούν με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που έχουν ληφθεί μέχρι τώρα. Για παράδειγμα, η χρήση υδατικών διαλυμάτων αντί καθαρών παραγόντων θα μπορούσε να περιορίσει τις παρενέργειες λόγω της χημικής επιθετικότητας του παράγοντα που χρησιμοποιείται, όπως το οίδημα για γλυκερίνη στο δέρμα. Επιπλέον, η αναστρεψιμότητα της διαδικασίας έχει αποδειχθεί πλήρως για υδατικά διαλύματα των παραγόντων, σε αντίθεση με μη αναστρέψιμες επιδράσεις, όπως οίδημα ιστού και μορφολογικός μετασχηματισμός που συμβαίνει όταν ο παράγοντας καθαρισμού χορηγείται αδιάλυτος (για παράδειγμα η ινιδική αναδιάταξη των ινών κολλαγόνου μετά την εμφύσηση σε 100% γλυκερίνη).

Πρακτικές και Εφαρμογές Οπτικού Καθαρισμού Ιστών					
Ιστός	Μέθοδος Καθαρισμού	Ουσία Εκκαθάρισης/ Πρωτόκολλο	Τεχνική Παρατήρησης	Δυνατότητα Καθαρισμού	Αναφορά
Γαστρεντερικοί ιστοί	In-vitro	Προπυλενογλυκόλη	Οπτική Τομογραφία Συνοχής	Πιο αναλυτικές μικροδομές	Wang et. al. [121]
Πλακώδης επιθηλιακός ιστός	In-vivo	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), Γλυκερόλη	Φάσμα ανάκλασης	Το DMSO είναι πιο αποτελεσματικό από τη γλυκερίνη	Millon et al. [122]
Ανθρώπινος σκληρός οφθαλμός	In-vitro	Γλυκόζη	Φασματοφωτόμετρο	Σημαντική μείωση της διασποράς	Bashkatov et al. [123]
Δέρμα αρουραίου	In-vivo	Γλυκερίνη	Φάσμα ανάκλασης, οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.	Μείωση της ανάκλασης, του πάχους του δέρματος και της διαμέτρου των ινών κολλαγόνου	Wen et al. [124]
Δέρμα χίρου	In-vitro	Γλυκόζη	Οπτική τομογραφία συνοχής Swert-Source	Το υψηλότερο οπτικό αποτέλεσμα καθαρισμού σε γλυκόζη 50%.	Sudheendran et al. [125]
Δέρμα χίρου	In-vitro	Άνυδρη γλυκερίνη	Φασματομετρία σε συνδυασμό με ολοκλήρωση σφαίρας	Μείωση της σκέδασης κατά 76,6% και αύξηση του βάθους διείσδυσης κατά 84,1% στους 45°C	Deng et al. [126]
Ραχιαία επιδερμίδα αρουραίου	Ex-vivo	DMSO Γλυκερόλη Γλυκόζη	Φωτοακουστική ανίχνευση	Βελτίωση της ανίχνευσης βαθιάς σφραγισμένων αιμοφόρων αγγείων και της ποιότητας εικόνας	Liu et al. [127]
Μυοσκελετικοί ιστοί	In-vitro	Φρουκτόζη	Στερεοσκοπικό ανατομικό μικροσκόπιο	Ενεργοποίηση in situ μοτίβων των διεργασιών των οστεοκυττάρων και του λακνοσωληνικού συστήματος βαθιά μέσα στο ανοργανοποιημένο φλοιώδες οστό	Clave et. al. [128]
Όγκοι ιστού εγκεφάλου	Ex-vivo	Υδρογέλη CLARITY. μεθανόλη iDISCO	Τρισδιάστατη μικροσκοπία	Πιο λεπτομερής 3D απεικόνιση	Lagerweij et. al. [129]
Ανθρώπινη σκληρή μήνιγγα	In-vitro	Γλυκόζη	Πολυκαναλικό φασματόμετρο	Διαφορετική αποτελεσματικότητα καθαρισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης	Genina et. al. [130]
Σκληροί ιστοί δοντιών	In-vitro	Γλυκερόλη που σχετίζεται με νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου και νιτρικού αργύρου	Οπτική τομογραφία συνοχής	Καλύτερη διάκριση υγιών και απιονισμένων σκληρών ιστών σε επιφάνειες απόφραξης	Carneiro et. al. [131]
Ρίζα δοντιού	In-vitro	Γλυκερόλη Προπυλενογλυκόλη	Οπτική τομογραφία συνοχής	Βελτίωση της διάγνωσης της τερηδόνας και άλλων ελαττωμάτων στις επιφάνειες των ριζών.	Yang et. al. [132]

Πίνακας 3 : Πρακτικές και Εφαρμογές Οπτικού Καθαρισμού Ιστών [120]

Ο Πίνακας 3 συγκεντρώνει τα κύρια ευρήματα της βιβλιογραφίας σε διαφορετικές πρακτικές και εφαρμογές οπτικού καθαρισμού ιστών.

Μεθοδολογικό και Τεχνολογικό Υπόβαθρο

Στην παρούσα εργασία, για τις ανάγκες μοντελοποίησης χρησιμοποιήθηκε ένα πρόγραμμα προσομοίωσης CAD (Computer Aided Design), η δε χρησιμοποιηθείσα μεθοδολογία είναι η μέθοδος πεπερασμένων στοιχείων (FEM – Finite Element Method).

3.1. Πρόγραμμα Προσομοίωσης CAD

Ο σχεδιασμός με τη βοήθεια υπολογιστών (CAD) ορίζεται ως η χρήση υπολογιστών (ή σταθμών εργασίας) για τη δημιουργία, τροποποίηση, ανάλυση ή βελτιστοποίηση ενός σχεδίου. Το λογισμικό CAD χρησιμοποιείται για την αύξηση της παραγωγικότητας του σχεδιαστή, για να βελτιώσει την ποιότητα του σχεδιασμού, μέσω τεκμηρίωσης, και να δημιουργήσει μια βάση δεδομένων για την κατασκευή. Η έξοδος CAD είναι συχνά με τη μορφή ηλεκτρονικών αρχείων για εκτύπωση, μηχανική κατεργασία ή άλλες εργασίες κατασκευής.

Το λογισμικό CAD για μηχανικό σχεδιασμό, χρησιμοποιεί, είτε διανυσματικά γραφικά για την απεικόνιση των αντικειμένων της παραδοσιακής σύνταξης, είτε μπορεί επίσης να παράγει raster graphics (ψηφιακή εικόνα τύπου bitmap) που δείχνει τη συνολική εμφάνιση των σχεδιαζόμενων αντικειμένων. Ωστόσο, πρόκειται για κάτι περισσότερο από απλά σχήματα. Όπως και στη χειροκίνητη σύνταξη τεχνικών και μηχανικών σχεδίων, η παραγωγή CAD πρέπει να μεταφέρει

πληροφορίες, όπως υλικά, διαδικασίες, διαστάσεις και ανοχές, σύμφωνα με συγκεκριμένες συμβάσεις εφαρμογής.

Το CAD είναι μια σημαντική βιομηχανική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές εφαρμογές, όπως οι αυτοκινητοβιομηχανίες, η ναυπηγική και η αεροδιαστημική βιομηχανία, ο βιομηχανικός και αρχιτεκτονικός σχεδιασμός, η προσθετική, η προσομοίωση οργάνων και πολλά άλλα. Λόγω της τεράστιας οικονομικής σημασίας του, το CAD υπήρξε μια σημαντική κινητήρια δύναμη για την έρευνα στον τομέα της υπολογιστικής γεωμετρίας, των γραφικών ηλεκτρονικών υπολογιστών (υλικού και λογισμικού) και της διακριτής διαφορικής γεωμετρίας.

Το CAD αποτελεί μέρος της δραστηριότητας ανάπτυξης ψηφιακών προϊόντων (DPD) στο πλαίσιο των διαδικασιών διαχείρισης του κύκλου ζωής του προϊόντος (PLM) και, ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται μαζί με άλλα εργαλεία, τα οποία είναι, είτε ολοκληρωμένες μονάδες, είτε αυτόνομα προϊόντα όπως:

- Υπολογιστική τεχνική (CAE:Computer-Aided Engineering) και ανάλυση πεπερασμένων στοιχείων (FEA)
- Υπολογιστική υποβοήθηση (CAM:Computer-Aided Manufacturing) που περιλαμβάνει οδηγίες για μηχανές ψηφιακού ελέγχου υπολογιστών (CNC: Computer Numerical Control)
- Φωτορεαλιστική απόδοση και προσομοίωση κίνησης
- Διαχείριση εγγράφων και έλεγχος αναθεώρησης με τη διαχείριση δεδομένων προϊόντων (PDM: Product Data Management).

Κάθε πρόγραμμα CAD αποτελείται από τα εξής μέρη:

❖ ***Pre-processor***

Ένας προεπεξεργαστής (*Pre-Processor*) είναι ένα πρόγραμμα που επεξεργάζεται τα δεδομένα εισόδου του, ώστε να παράγει αποτελέσματα που χρησιμοποιούνται ως είσοδος σε άλλο πρόγραμμα. Η έξοδος είναι μια προεπεξεργασμένη μορφή των δεδομένων εισόδου, η οποία χρησιμοποιείται μεταγενέστερα από προγράμματα όπως οι μεταγλωττιστές. Η ποσότητα και το είδος της επεξεργασίας εξαρτάται από τη φύση του προεπεξεργαστή. Ορισμένοι προεπεξεργαστές είναι ικανοί μόνο

να εκτελούν σχετικά απλές αντικαταστάσεις κειμένου και μακροεντολές, ενώ άλλοι έχουν τη δύναμη πλήρους γλώσσας προγραμματισμού.

❖ **Compiler**

Μεταγλωττιστής (Compiler) ονομάζεται το πρόγραμμα που διαβάζει κώδικα γραμμένο σε μια γλώσσα προγραμματισμού (την πηγαία γλώσσα) και τον μεταφράζει σε ισοδύναμο κώδικα σε μια άλλη γλώσσα προγραμματισμού (τη γλώσσα στόχο). Το κείμενο της εισόδου ονομάζεται πηγαίος κώδικας (source code), ενώ η έξοδος του προγράμματος, η οποία συχνά έχει δυαδική μορφή, αντικειμενικός κώδικας (object code). Ο όρος “μεταγλωττιστής” χρησιμοποιείται κυρίως για προγράμματα που μεταφράζουν μια γλώσσα προγραμματισμού υψηλού επιπέδου σε μια γλώσσα χαμηλότερου επιπέδου (όπως η συμβολική γλώσσα ή η γλώσσα μηχανής).

❖ **Post-Processor**

Ο *μετα-επεξεργαστής (Post-Processor)* είναι μια υπορουτίνα λογισμικού (υπο-πρόγραμμα) που μετατρέπει το αποτέλεσμα του εργαλείου λογισμικού CAD σε γραφικό ή μη γραφικό αποτέλεσμα. Ο μετα-επεξεργαστής είναι ανεξάρτητος από το υλικό και είναι ένα λογισμικό που προσαρμόζει ή καταρτίζει το μονοπάτι εργαλείων σε αναγνώσιμη γλώσσα ή κινήσεις.

3.2. Μέθοδος Πεπερασμένων Στοιχείων (FEM: Finite Element Method)

3.2.1. Ανάλυση Πεπερασμένων Στοιχείων (FEA: Finite Element Analysis)

Η ανάλυση πεπερασμένων στοιχείων (FEA) είναι μια αριθμητική μέθοδος για την επίλυση προβλημάτων της μηχανικής και της μαθηματικής φυσικής. Οι τυπικές περιοχές ενδιαφέροντος περιλαμβάνουν τη δομική ανάλυση, τη μεταφορά θερμότητας, τη ροή ρευστών, τη μεταφορά μάζας και το ηλεκτρομαγνητικό δυναμικό. Η αναλυτική λύση αυτών των προβλημάτων απαιτεί γενικά την επίλυση προβλημάτων συνοριακών συνθηκών για μερικές διαφορικές εξισώσεις. Η φόρμουλα της ανάλυσης πεπερασμένων στοιχείων του προβλήματος οδηγεί σε ένα σύστημα αλγεβρικών εξισώσεων. Για να λύσει το πρόβλημα, υποδιαιρεί ένα

μεγάλο σύστημα σε μικρότερα, απλούστερα μέρη που ονομάζονται πεπερασμένα στοιχεία. Οι απλές εξισώσεις που μοντελοποιούν αυτά τα πεπερασμένα στοιχεία, στη συνέχεια, συναρμολογούν ένα μεγαλύτερο σύστημα εξισώσεων που μοντελοποιεί ολόκληρο το πρόβλημα. Τέλος, η FEA χρησιμοποιεί μεθόδους για τον υπολογισμό των μεταβλητών, για να προσεγγίσει μια λύση, ελαχιστοποιώντας τα σφάλματα.

3.2.2. Βασικές Αρχές της FEA

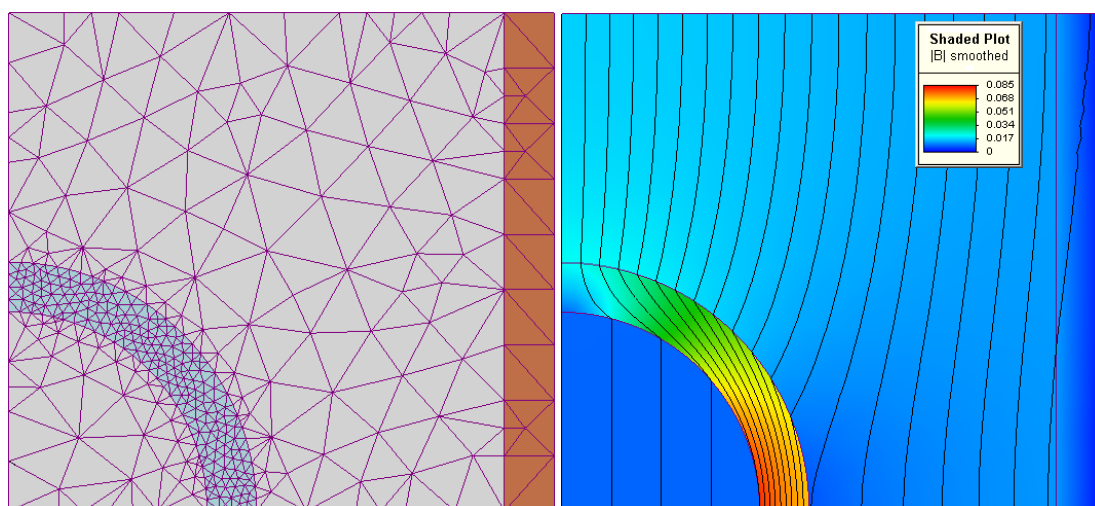
Η υποδιαίρεση ενός ολόκληρου τομέα σε απλούστερα μέρη έχει πολλά πλεονεκτήματα:

- *Ακριβής αντιπροσώπευση σύνθετης γεωμετρίας*
- *Συμπερίληψη ανόμοιων ιδιοτήτων υλικών*
- *Εύκολη παρουσίαση της συνολικής λύσης*
- *Καταγραφή των τοπικών επιδράσεων*

Με βάση την παραπάνω μέθοδο, μια τυπική εργασία περιλαμβάνει: (1) τη διαίρεση του πεδίου του προβλήματος σε μια συλλογή υποτομέων, με κάθε υποτομέα να αντιπροσωπεύεται από ένα σύνολο εξισώσεων-στοιχείων, ακολουθούμενο από (2) συστηματικό ανασυνδυασμό όλων των συνόλων των εξισώσεων σε ένα παγκόσμιο σύστημα εξισώσεων, για τον τελικό υπολογισμό. Το παγκόσμιο σύστημα εξισώσεων έχει γνωστές τεχνικές λύσης και μπορεί να υπολογιστεί από τις αρχικές τιμές του αρχικού προβλήματος για να αποκτήσει μια αριθμητική τιμή. Στο πρώτο παραπάνω βήμα, οι εξισώσεις είναι απλές και προσεγγίζουν τις αρχικές πολύπλοκες εξισώσεις που πρέπει να μελετηθούν, όπου οι αρχικές εξισώσεις είναι συχνά μερικές διαφορικές εξισώσεις (PDE: Partial Differential Equation).

3.2.3. Εφαρμογές FEA

Η FEM κατανοείται καλύτερα από την πρακτική της εφαρμογή, γνωστή ως ανάλυση πεπερασμένων στοιχείων (FEA). Η FEA, είναι ένα υπολογιστικό εργαλείο για την εκτέλεση μηχανικής ανάλυσης. Περιλαμβάνει τη χρήση τεχνικών δημιουργίας πλέγματος για τη διαίρεση ενός πολύπλοκου προβλήματος σε μικρά στοιχεία, καθώς και τη χρήση λογισμικού που κωδικοποιείται με αλγόριθμο FEM. Κατά την εφαρμογή της FEA, το πρόβλημα είναι συνήθως ένα φυσικό σύστημα με την υποκείμενη φυσική, όπως η εξίσωση θερμότητας, η εξίσωση μεταφοράς μάζας ή οι εξισώσεις Navier-Stokes που εκφράζονται, είτε σε PDE, είτε σε ενσωματωμένες εξισώσεις, ενώ τα διαιρεμένα μικρά στοιχεία στο σύνθετο πρόβλημα αντιπροσωπεύουν συνοριακές συνθήκες στο φυσικό σύστημα.



Εικόνα 17 : Παραδείγματα FEA

Η FEA είναι μια καλή επιλογή, για την ανάλυση προβλημάτων σε περίπλοκες περιοχές, όταν αλλάζει η περιοχή, με ένα κινούμενο όριο, όταν η επιθυμητή ακρίβεια διαφέρει σε ολόκληρο τον τομέα ή όταν η λύση στερείται ομαλότητας. Οι προσομοιώσεις FEA παρέχουν έναν πολύτιμο πόρο καθώς καταργούν πολλαπλές απόπειρες δημιουργίας και δοκιμής σκληρών πρωτοτύπων για διάφορες καταστάσεις υψηλής πιστότητας. Για παράδειγμα, σε μια προσομοίωση διάχυσης ενός φαρμάκου στις διάφορες στιβάδες του δέρματος, αντί να γίνουν άμεσα μελέτες in vivo, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί προσομοίωση του αντίστοιχου φαινομένου (Εικόνα 17).

Όσον αφορά τον τομέα της βιοϊατρικής, η ανάλυση των πεπερασμένων στοιχείων (FEA) παίζει σπουδαίο ρόλο, καθώς για τη μελέτη και τη μοντελοποίηση τεχνητών οργάνων, οστών, αγγείων, διάχυσης φαρμάκων κλπ, είναι απαραίτητη η επίλυση πολύπλοκων διαφορικών εξισώσεων. Οι εξισώσεις αυτές μπορούν να επιλυθούν με την ανάλυση τους σε απλούστερα προβλήματα τα οποία λύνονται με μεγαλύτερη ευκολία και έτσι οδηγούν στην λύση του αρχικού προβλήματος.

3.3. Το Λογισμικό *FEBioStudio*

Για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε, ως πρόγραμμα CAD, το λογισμικό *FEBioStudio*[®] (Finite Elements For Biomechanics). Το *FEBioStudio* είναι ένα πρόγραμμα πεπερασμένων στοιχείων που έχει σχεδιαστεί ειδικά για εφαρμογές εμβιομηχανικής και βιοφυσικής. Προσφέρει σενάρια μοντελοποίησης, βασικά μοντέλα και συνοριακές συνθήκες που σχετίζονται με πολλά ερευνητικά πεδία σε αυτούς τους τομείς. Όλα τα χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαζί χωρίς προβλήματα, δίνοντας στον χρήστη ένα ισχυρό εργαλείο για την επίλυση 3D προβλημάτων στην υπολογιστική βιομηχανία. Το λογισμικό είναι ανοικτού κώδικα και είναι εκ των προτέρων διαθέσιμο για πλατφόρμες Windows, Mac OS X και Linux.

Η ανάπτυξη, η διανομή και η υποστήριξη του προγράμματος είναι μια κοινή προσπάθεια μεταξύ του Musculoskeletal Research Laboratories του Πανεπιστημίου της Utah και του Musculoskeletal Biomechanics Laboratory του Πανεπιστημίου Columbia. Το *FEBioStudio* επικεντρώνεται ειδικά στην επίλυση των μη γραμμικών μεγάλων προβλημάτων παραμόρφωσης στη εμβιομηχανική και τη βιοφυσική.

Στην προηγούμενη έκδοση του *FEBioStudio*, το *FEBio*, οι χρήστες χρησιμοποιούσαν το λογισμικό *PreView* για να ρυθμίσουν τα μοντέλα και το *PostView* για οπτικοποίηση και ανάλυση. Το *FEBioStudio* ενσωματώνει αυτά τα δύο πακέτα λογισμικού, σε συνδυασμό με την παροχή πολλών περισσότερων δυνατοτήτων. Επίσης, η εφαρμογή γραμμής εντολών που υλοποιεί τους αλγόριθμους επίλυσης, είναι και αυτή, ενσωματωμένη πλέον, στο *FEBioStudio*.

Έτσι, το FEBioStudio αποτελεί τη νεότερη πλατφόρμα ανάπτυξης για τη δημιουργία, την εκτέλεση και την ανάλυση μοντέλων *FEBio*, με πολύ περισσότερες δυνατότητες. Επιτρέπει στους χρήστες να εισάγουν γεωμετρία και πλέγματα από διάφορες μορφές αρχείων, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων μορφών *CAD (BREP, STEP)* και προσφέρει δυνατότητες δημιουργίας πλέγματος tet. Οι χρήστες μπορούν στη συνέχεια να ρυθμίσουν τα όρια, τις συνθήκες φόρτωσης και επαφής και να ορίσουν παραμέτρους υλικού και ανάλυσης. Τα μοντέλα μπορούν να εκτελεστούν απευθείας από τη διεπαφή του *FEBioStudio* ή να εξαχθούν στο αρχείο εισόδου *FEBio* με μορφή xml. Τα μοντέλα μπορούν να εκτελεστούν τοπικά ή να σταλούν σε απομακρυσμένο διακομιστή. Μετά την ολοκλήρωση του *FEBio*, τα αποτελέσματα μπορούν να φορτωθούν απευθείας στο *FEBioStudio* για οπτικοποίηση και ανάλυση [135].

3.3.1. Περιγραφή του Λογισμικού *FEBioStudio*

Το λογισμικό *FEBioStudio* αποτελείται από τα 3 μέρη:

- *Περιβάλλον Δημιουργίας Μοντέλου (Pre-Processor)*
- *Μεταγλώττιση (Compiler)*
- *Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων (Post-Processor)*

❖ *Περιβάλλον Δημιουργίας Μοντέλου*

Το *Περιβάλλον Δημιουργίας Μοντέλου* είναι ένας προεπεξεργαστής πεπερασμένων στοιχείων (FE: Finite Element) που έχει σχεδιαστεί ειδικά για την επίλυση προβλημάτων FE για το *FEBioStudio*. Επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί ή να εισάγει πλεγματοποιήσεις, να καθορίζει τις συνοριακές συνθήκες και τις ιδιότητες των υλικών και να θέτει τις επιλογές ανάλυσης, όλα σε ένα φιλικό προς το χρήστη γραφικό περιβάλλον.

Το περιβάλλον δημιουργίας μοντέλου προσφέρει στον χρήστη τη δυνατότητα να δημιουργεί απλή γεωμετρία, με πολύ απλό και φιλικό τρόπο. Απλά μοντέλα, όπως κουτιά, κύλινδροι, σφαίρες και άλλα μπορούν να δημιουργηθούν γρήγορα.

Διάφορα εργαλεία επεξεργασίας πλέγματος είναι διαθέσιμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τροποποίηση της γεωμετρίας. Το περιβάλλον προσφέρει διάφορα εργαλεία για τη ρύθμιση των συνοριακών συνθηκών. Οι χρονικές μεταβολές των κομβικών μετατοπίσεων, οι κομβικές δυνάμεις, οι δυνάμεις πίεσης, η κινηματική στερεών σωμάτων μπορούν να δημιουργηθούν με τρόπο φιλικό προς τον χρήστη. Επίσης, πιο πολύπλοκες συνοριακές συνθήκες όπως οι επαφές μεταξύ των σωμάτων μπορούν να καθοριστούν εύκολα.

Τα υλικά μπορούν να οριστούν, χρησιμοποιώντας τον επεξεργαστή υλικών, ο οποίος προσφέρει μια εύκολη επισκόπηση των διαθέσιμων υλικών και των ιδιοτήτων τους. Το περιβάλλον υποστηρίζει σχεδόν όλα τα μοντέλα υλικών που διατίθενται στο *FEBioStudio*, συμπεριλαμβανομένων ιστροπικών υπερρεαλιστικών, εγκάρσιων ιστροπικών, πορωδών ελαστικών, στερεών σωμάτων και πολλών άλλων. Επίσης, προσφέρει εργαλεία για τη ρύθμιση των διαλυμένων ουσιών και των στερεών δεσμευμένων μορίων σε μια πολυφασική ανάλυση για τον ορισμό των χημικών αντιδράσεων.

❖ **Μεταγλώττιση**

Η μεταγλώττιση των μοντέλων πραγματοποιείται μέσω ενός μη γραμμικού προεπιλεγμένου *επιλυτή FE* και δεν διαθέτει δυνατότητες δημιουργίας πλέγματος. Επομένως, τα αρχεία εισόδου, πρέπει να δημιουργηθούν με λογισμικό προεπεξεργασίας. Η μεταγλώττιση υποστηρίζει στατικές και ημι-στατικές αναλύσεις για στερεά και παραμορφώσιμα σώματα. Σε μια δυναμική ανάλυση, τα αδρανειακά αποτελέσματα συμπεριλαμβάνονται στις εξισώσεις που ισχύουν για τον υπολογισμό της εξαρτώμενης από το χρόνο απόκρισης του συστήματος.

Το *FEBioStudio* υποστηρίζει ένα ευρύ φάσμα συνοριακών συνθηκών για να διαμορφώσει αλληλεπιδράσεις μεταξύ υλικών που σχετίζονται με προβλήματα εμβιομηχανικής. Επίσης, παρέχει την ικανότητα να διαχειρίζεται επαφή χωρίς τριβή για ελαστικά, ιξωδοελαστικά, άκαμπτα και πολυφασικά υλικά, καθώς και επαφή τριβής για τα παραπάνω υλικά. Τέλος, ο χρήστης μπορεί επίσης να καθορίσει μια δύναμη, για να διαμορφώσει τα αποτελέσματα.

❖ **Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων**

Το περιβάλλον μελέτης των αποτελεσμάτων είναι ένας μετα-επεξεργαστής πεπερασμένων στοιχείων που έχει σχεδιαστεί για να απεικονίζει και να αναλύει τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης. Μπορεί να εισαγάγει το αρχείο *FEBio* επέκτασης (PLT: Plotter File), καθώς και διάφορες άλλες μορφές δεδομένων. Προσφέρει επίσης πολλούς τρόπους, για να προστεθούν επιπλέον δεδομένα σε ένα ήδη φορτωμένο μοντέλο.

Το περιβάλλον εμφανίζει μια γραφική απεικόνιση του μοντέλου, καθώς και την εξάρτηση διαφόρων παραμέτρων σε σχέση με το χρόνο. Τα περιεχόμενα και η διάταξη της εμφάνισης, καθώς και τα σχέδια χρωμάτων και όλες οι επιλογές για την απόδοση επιπέδων, γραμμών και σημείων, μπορούν να προσαρμοστούν πλήρως από το χρήστη. Ακόμη, μπορεί να προστεθεί πρόσθετος οπτικός ρεαλισμός, χρησιμοποιώντας διαφάνεια και σκιές.

Το περιβάλλον μελέτης των αποτελεσμάτων προσφέρει επίσης διάφορα εργαλεία για τον ποσοτικό έλεγχο δεδομένων. Οι τιμές σε κόμβους και στοιχεία μπορούν να αναλυθούν απευθείας και όλα τα δεδομένα μπορούν να απεικονιστούν ως χρονικό ιστορικό. Επιπλέον πεδία δεδομένων μπορούν επίσης να εισαχθούν από εξωτερικά αρχεία δεδομένων και να εφαρμοστούν στο φορτωμένο μοντέλο[163].

3.3.2. Γραφικό Περιβάλλον Δημιουργίας Μοντέλου

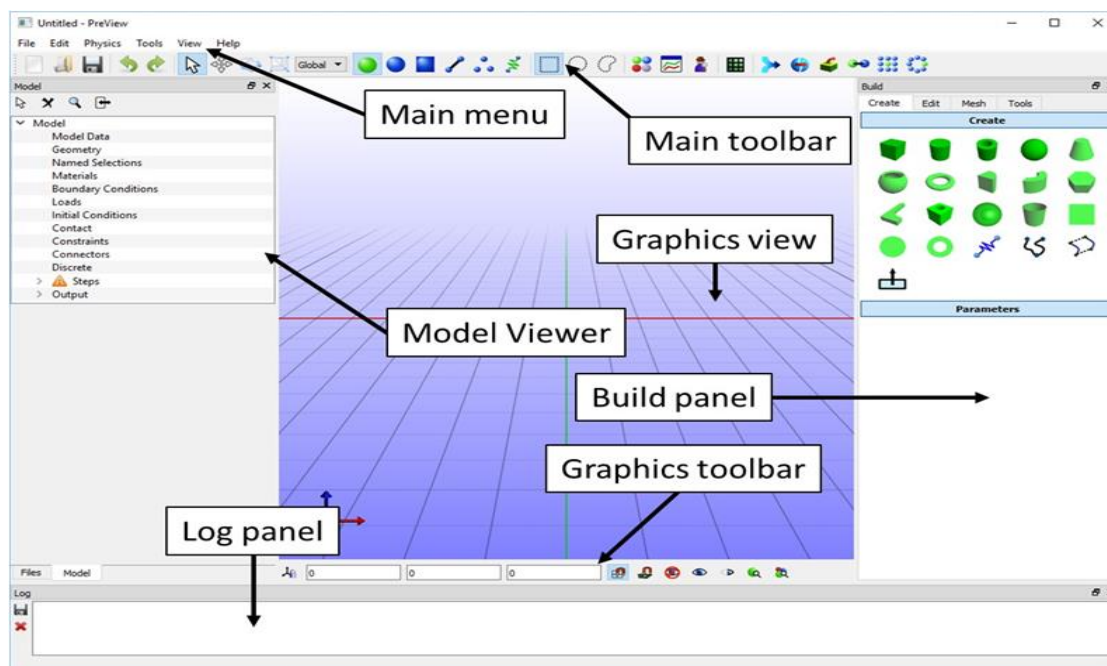
Αυτή η ενότητα δίνει μια σύντομη περιήγηση στο περιβάλλον δημιουργίας ενός μοντέλου μέσω ενός συνόλου οδηγιών. Ο αναγνώστης θα περιηγηθεί στο γραφικό περιβάλλον χρήστη (*GUI: Graphical User Interface*) και στα διάφορα στοιχεία του. Θα μάθει επίσης, βασικές δεξιότητες, για την κατασκευή μοντέλων *FE*.

❖ **Επισκόπηση του GUI Περιβάλλοντος Δημιουργίας Μοντέλου**

Η Εικόνα 21 δείχνει μια επισκόπηση των συνιστωσών του *GUI* του περιβάλλοντος. Στο *Main menu* εμφανίζονται όλα τα διαθέσιμα στοιχεία μενού. Η *Main Toolbar*, που βρίσκεται ακριβώς κάτω από το μενού, προσφέρει έναν

εναλλακτικό τρόπο για την επίκληση ορισμένων από αυτά τα στοιχεία μενού. Το Model Viewer παρουσιάζει μια επισκόπηση των στοιχείων του μοντέλου. Η Graphics View καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του γραφικού περιβάλλοντος (GUI) και εμφανίζει μια τρισδιάστατη προβολή του μοντέλου. Η Graphics Toolbar βρίσκεται κάτω από την Graphics View και εμφανίζει ορισμένες πληροφορίες, σχετικά με την προβολή γραφικών. Το Build panel είναι το σημείο, όπου μπορούν να βρεθούν τα περισσότερα από τα πρωτότυπα εργαλεία μοντελοποίησης και επεξεργασίας πλέγματος. Αποτελείται από διάφορους πίνακες εντολών, καθένας από τους οποίους προσφέρει διάφορα εργαλεία μοντελοποίησης και επεξεργασίας.

Για παράδειγμα, επιλέγοντας τον πίνακα Create θα εμφανιστούν επιλογές για τη δημιουργία νέας γεωμετρίας. Τα άλλα πλαίσια είναι: Edit για την αλλαγή ιδιοτήτων αντικειμένου, Mesh (Πλέγμα) για τη δημιουργία και επεξεργασία πλεγμάτων με πεπερασμένα στοιχεία και Tools που παραθέτει ορισμένες χρήσιμες λειτουργίες. Τα περισσότερα από τα πλαίσια στο περιβάλλον είναι dockable (αποδεκτά) panels που μπορούν να μετακινηθούν και να κλείσουν. Αν κλείνετε έναν πλαίσιο, μπορείτε να το εμφανίσετε ξανά βάζοντας το όνομα του στο κάτω μέρος του μενού View.



Εικόνα 18: Τα κύρια στοιχεία του περιβάλλοντος GUI

3.3.3. Μεταγλώττιση μέσω της Εφαρμογής Γραμμής Εντολών

Η εφαρμογή γραμμής εντολών (command line-cmd) δεν έχει τη δική του γραφική διεπαφή χρήστη (GUI) και πρέπει να εκτελείται από ένα κέλυφος ή γραμμή εντολών. Αυτό λειτουργεί σε διάφορες πλατφόρμες υπολογιστών, συμπεριλαμβανομένων των Windows, του Mac OSX και πολλών εκδόσεων του Linux.

Μόλις ολοκληρωθεί η μοντελοποίηση, ακολουθεί η μεταγλώττιση του. Μια πρακτική προσέγγιση είναι η εκτέλεση της μεταγλώττισης μέσα από το περιβάλλον του *FEBioStudio*. Μέσω αυτού του τρόπου, θα πραγματοποιηθεί η μεταγλώττιση του προγράμματος στο υπόβαθρο και στη συνέχεια θα είναι δυνατή η μελέτη των αποτελεσμάτων μέσω του *Περιβάλλοντος Μελέτης Αποτελεσμάτων*.

3.3.4. Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων (Post-Processor)

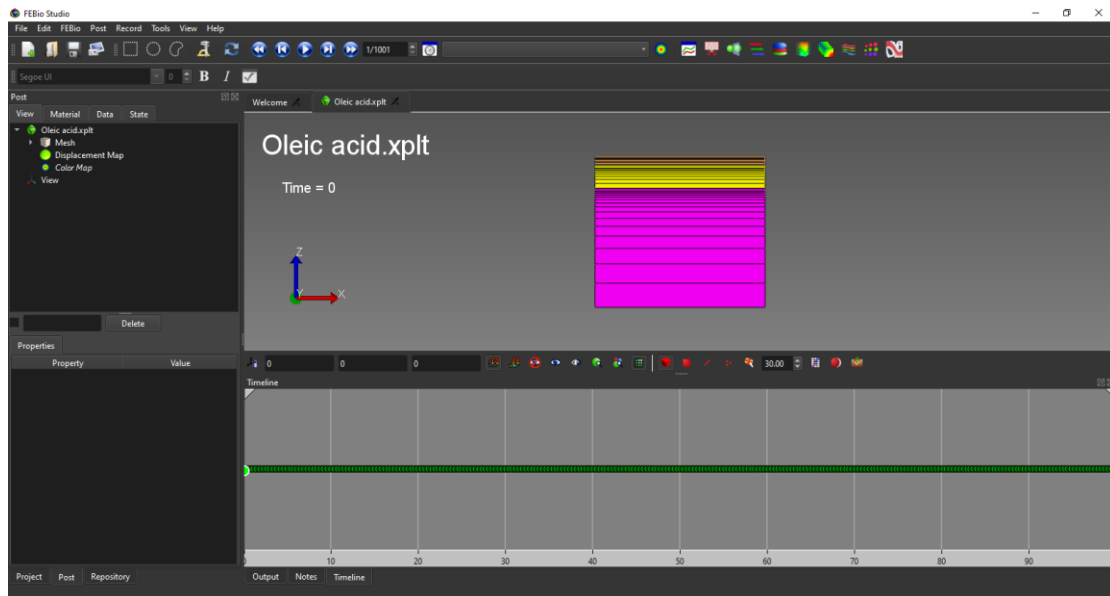
Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, το περιβάλλον μελέτης των αποτελεσμάτων είναι μια εφαρμογή μετα-επεξεργασίας πεπερασμένων στοιχείων (FE), που έχει σχεδιαστεί για να προβάλλει τα αρχεία εξόδου. Προσφέρει πολλές δυνατότητες μετα-επεξεργασίας, όπως η δημιουργία σχεδίων επιφανειών, οριζόντιων τομών και πολλών άλλων. Επιπλέον, προσφέρει μια φιλική προς το χρήστη γραφική διεπαφή, που δείχνει την τρισδιάστατη απεικόνιση και την απεικόνιση των μοντέλων πεπερασμένων στοιχείων.

❖ *Άνοιγμα Αρχείου*

Για την εισαγωγή στο περιβάλλον μελέτης των αποτελεσμάτων, θα πρέπει να επιλεγεί από την αρχική οθόνη του *FEBioStudio*, *Open Model...* και στη συνέχεια να επιλεγεί το αντίστοιχο προς μελέτη .xplt αρχείο.

❖ Περιήγηση στο Πρότυπο Προβολής

Μετά τη φόρτωση του μοντέλου, στο περιβάλλον μελέτης των αποτελεσμάτων η οθόνη θα πρέπει να μοιάζει με την Εικόνα 22. Στην αριστερή πλευρά της οθόνης εμφανίζεται το *Model Viewer*, το οποίο παρουσιάζει μια ιεραρχική επισκόπηση των περιεχομένων του μοντέλου. Από προεπιλογή, το περιβάλλον θα αντιστοιχίσει έναν *Displacement Map* και έναν *Color Map* στο μοντέλο σας.



Εικόνα 19 : Το Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων με Φορτωμένο Αρχείο - Αρχικό

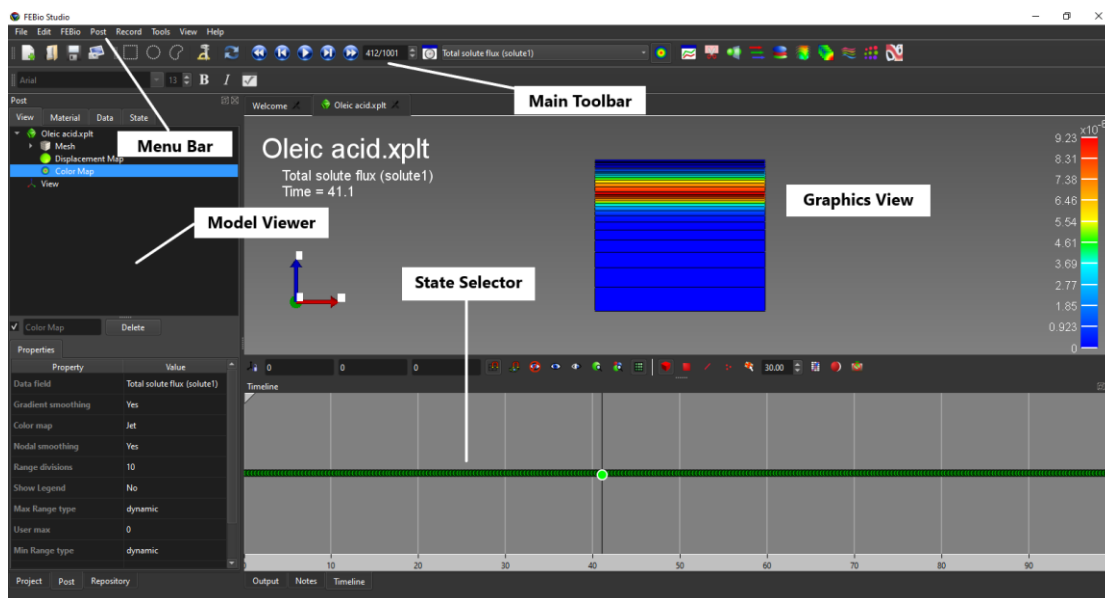
Ο *Displacement Map* ορίζει έναν χάρτη που θα παραμορφώσει το μοντέλο και ο *Color Map* θα καθορίσει το χρώμα με το οποίο εμφανίζεται το μοντέλο. Επιλέγοντας οποιοδήποτε στοιχείο στο *Model Viewer* θα εμφανιστεί η λίστα ιδιοτήτων του κάτω από αυτό.

❖ Επισκόπηση του GUI Περιβάλλοντος Μελέτης Αποτελεσμάτων

Το Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων διαθέτει μια γραφική διεπαφή χρήστη (GUI) που προσφέρει έναν εύκολο τρόπο αλληλεπίδρασης με το FE model. Η Εικόνα 20 δείχνει το GUI, αφού ξεκινήσει το πρόγραμμα και φορτωθεί το αρχείο.

Το GUI αποτελείται από διάφορα στοιχεία. Το *Menu Bar* στην κορυφή επιτρέπει την πρόσβαση στις διάφορες επιλογές και ρυθμίσεις του περιβάλλοντος. Κάτω από τη γραμμή μενού υπάρχουν διάφορες γραμμές εργαλείων. Η *Graphics View*,

είναι η μεγάλη κεντρική περιοχή του παραθύρου και δείχνει μια τρισδιάστατη προβολή του μοντέλου FE. Στο κάτω μέρος της οθόνης ο *State Controller* χρησιμοποιείται για την επιλογή της κατάστασης μοντέλου που εμφανίζεται.



Εικόνα 20 : Το Περιβάλλον Μελέτης Αποτελεσμάτων με Φορτωμένο Αρχείο - Τελικό

Στην αριστερή πλευρά του παραθύρου εμφανίζονται επιπρόσθετα πλαίσια τα οποία είναι οργανωμένα σε μια λίστα με πίνακες. Κάνοντας κλικ στις καρτέλες στο επάνω μέρος του παραθύρου (κάτω από τη γραμμή εργαλείων) ενεργοποιούνται οι πίνακες :

- *File Viewer*: Επιτρέπει στο χρήστη να προηγείται σε φακέλους και να ανοίγει αρχεία.
- *Model Viewer*: Εμφανίζει το περιεχόμενο των ανοιχτών φακέλων.
- *Material viewer*: Εμφανίζει μια επισκόπηση των διαφόρων υλικών ή τμημάτων του μοντέλου.
- *Data Manager*: Επιτρέπει στους χρήστες να αφαιρούν, να προσθέτουν ή να καταγράφουν πεδία δεδομένων.
- *State Manager*: Καταγράφει όλες τις καταστάσεις στο μοντέλο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση καταστάσεων.
- *Tools panel*: Εμφανίζει μερικά χρήσιμα εργαλεία.

4.1. Σκοπός της Παρούσας μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετάται η μοντελοποίηση της διάχυσης διαδερμικών συστημάτων με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων. Ο σκοπός της μελέτης είναι να εξεταστεί η επίδραση διαδερμικών συστημάτων, όπως του ελαϊκού οξέος (OA) και της προπυλενογλυκόλης (PG), ως ενισχυτικά της οπτικής διαπερατότητας του δέρματος, κατά τη διενέργεια μια εξέτασης OCT.

Το δέρμα είναι ένα περίπλοκο βιολογικό σύστημα που διαθέτει ένα πλήθος συζευγμένων φυσικών διεργασιών που δρουν συντονισμένα ή ιεραρχικά. Από την άποψη της εμβιομηχανικής, το δέρμα είναι κατά κύριο λόγο μια πολυφασική και πολλαπλής κλίμακας δομή η οποία, περιλαμβάνει ένα πλούσιο σύνολο μηχανικών ιδιοτήτων και αλληλεπιδράσεων. Η βιολογική φύση αυτής της δομής καθιστά αυτές τις ιδιότητες πολύ δυναμικές, και όπως οι περισσότεροι βιολογικοί ιστοί, υπάρχει έντονη μεταβλητότητα, ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, την εθνικότητα και την έκθεση σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στο μεσο- και μακρο-σκοπικό επίπεδο, το δέρμα θεωρείται γενικά ως ένα συγκρότημα πολλαπλών στρωμάτων που αποτελείται από τρεις κύριες διακριτές δομές: την επιδερμίδα, το χόριο και το υπόδερμα, το καθένα με διαφορετικούς συντελεστές διάχυσης. Η επιδερμίδα, η οποία δεν έχει αγγεία, χωρίζεται στην κεράτινη στιβάδα και στη ζώσα επιδερμίδα. Η κεράτινη στιβάδα έχει τον χαμηλότερο συντελεστή διάχυσης και αποτελείται από “γεμισμένα” με κερατίνη, βιολογικά ανενεργά, αποξηραμένα, πεπλατυσμένα κύτταρα. Αυτό το στρώμα, στο σύνολό

του είναι συνεχές, με πολύ μικρό κενό χώρο και παρέχει σχεδόν όλη τη μηχανική αντοχή της επιδερμίδας. Το επόμενο στρώμα είναι η ζώσα επιδερμίδα που παρέχει μια σταθερή παροχή κυττάρων στην κεράτινη στοιβάδα για να διατηρηθεί.

Για τους παραπάνω λόγους, χρησιμοποιούνται πολλές φορές διαδερμικά συστήματα, τα οποία ονομάζονται οπτικά συστήματα διαύγασης (Optical Clearing Agents – OCAs), όπως το ελαϊκό οξύ και η προπυλενογλυκόλη, προκειμένου να ενισχύσουν την οπτική διαπερατότητα του δέρματος, είτε για διαγνωστικούς σκοπούς (OCT), είτε για αύξηση της διάχυσης κάποιων φαρμάκων στα κατώτερα στρώματα.

Όσον αφορά το OCT, στην προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται ένα OCA ως index matching gel το οποίο είναι ένα υλικό που εξομαλύνει το δείκτη διάθλασης ενός υλικού (δέρμα) με το υπεράνω αυτού στρώμα (αέρα) και με τις επιμέρους ετερογενείς περιοχές του δέρματος (βλ. Εισαγωγή). Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η εξισορρόπηση του συντελεστή διάχυσης της κεράτινης στιβάδας ($n \sim 1.55$) με εκείνον του αέρα ($n \sim 1.00$). Έτσι λοιπόν, όταν τα δύο υλικά με τον ίδιο δείκτη έρχονται σε επαφή, το φως περνά από τη μία στην άλλη χωρίς ανάκλαση ή διάθλαση, ενώ ανάλογη είναι η επίδραση στο εσωτερικό του δέρματος. Αυτό μας εξασφαλίζει την καλύτερη ποιότητα της εικόνας, χωρίς να έχουμε φαινόμενα ανάκλασης και διάθλασης, καθώς το φως θα μπορεί να μεταφερθεί απρόσκοπτα, μέσω του δέρματος, και να φτάσει στα υποκείμενα όργανα και ιστούς.

4.2. Μοντελοποίηση της Διάχυσης Διαδερμικών Συστημάτων με τη Μέθοδο των Πεπερασμένων Στοιχείων

4.2.1. Υλικά και Μέθοδοι

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα πεπερασμένων στοιχείων *FEBioStudio™*.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μοντελοποίηση της διάχυσης των διαδερμικών συστημάτων, του ελαϊκού οξέος (OA) και της προπυλενογλυκόλης (PG), τα οποία χρησιμοποιούνται ως index matching gels κατά τη διενέργεια της μη επεμβατικής διαγνωστικής και απεικονιστικής τεχνικής, OCT.

Αρχικά, για την κατανόηση και τον προσδιορισμό της διάχυσης των index matching gels θα πρέπει να αναφερθούν οι βασικοί φυσικοί και χημικοί νόμοι, στους οποίους στηρίχθηκε η παρούσα μελέτη.

4.2.1.1. Ιδιότητες του Δέρματος και των Στρωμάτων

Το δέρμα είναι ένα ετερογενές όργανο: η κεράτινη στιβάδα (Stratum Corneum - SC) είναι λιπόφιλη, ενώ τα κατώτερα στρώματα, η βιώσιμη επιδερμίδα (Viable Epidermis - VE) και το χόριο (Dermis), είναι σχετικά υδρόφιλα. Έτσι, αναμένεται ότι η διείδυση ενός μορίου ή ένωσης ποικίλλει ανάλογα με το στρώμα. [24]

Το SC έχει επίσης, διαφορετική λιποφιλικότητα από το VE και το dermis. Η κεράτινη στιβάδα παρουσιάζει την κύρια λειτουργία μηχανικού φραγμού για τη χορήγηση μορίων ή ενώσεων μέσω του δέρματος, μαζί με σφιχτές συνδέσεις, οι οποίες βρίσκονται μέσα στη βιώσιμη επιδερμίδα. Έπειτα, τα μόρια θα διαχυθούν μέσω της υδρόφιλης βιώσιμης επιδερμίδας και του χόριου, στην υδατική συστηματική κυκλοφορία. Επομένως, ένα ρεαλιστικό μοντέλο του δέρματος θα απαιτούσε τη μοντελοποίηση της SC, της VE, του χόριου, όπως επίσης και της ροής του αίματος ανθρώπου, καθώς, τριχοειδή αγγεία υπάρχουν στο θηλώδες και στο δικτυωτό χόριο, αντίστοιχα. Η μοντελοποίηση της ροής του αίματος θα απαιτούσε επίσης τη συμπερίληψη των σχετικών βιοχημικών διεργασιών στα τριχοειδή αγγεία, ένα εγχείρημα που θα ξεπερνούσε το πεδίο εφαρμογής αυτής της μελέτης. Επομένως, το χόριο και η ροή του αίματος δεν συμπεριλήφθηκε στο υπολογιστικό κομμάτι της παρούσας μελέτης.

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, επιλύθηκε η διάχυση των index matching gels και υποτέθηκαν ισοθερμικές συνθήκες, δηλαδή η θερμοκρασία του σώματος να είναι ίση με αυτήν του περιβάλλοντος. Επιπλέον, δεν συμπεριλήφθηκε, ούτε η μεταφορά νερού λόγω αφυδάτωσης του δέρματος, ούτε

η προκύπτουσα συρρίκνωση ή οίδημα του δέρματος, καθώς επίσης, δεν λήφθηκε υπόψη το φαινόμενο της ώσμωσης του δέρματος. Για να περιγράψουμε τη συγκέντρωση C_i^α της ουσίας α του υλικού i [kg m^{-3}], διατυπώνουμε το 2^ο νόμο του *Fick* με τη διαφορική του μορφή:

$$\frac{\partial C_i^\alpha}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i^\alpha \nabla C_i^\alpha) = S_s^\alpha \quad \text{Εξίσωση 4.1}$$

Όπου:

- D_i^α : είναι ο αντίστοιχος συντελεστής διάχυσης ή η ικανότητα διάχυσης [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$],
- S_s^α : είναι ένας ογκομετρικός όρος πηγής για την ουσία α [$\text{kg m}^{-3}\text{s}^{-1}$], και
- t : είναι ο χρόνος [s].

Κανένας όρος πηγής δεν συμπεριλήφθηκε σε αυτήν τη μελέτη, καθώς δεν εξετάστηκαν οι συνεισφορές των ακόλουθων διαδικασιών:

- Η είσοδος της ένωσης στα τριχοειδή αγγεία και των αγγεία του σώματος. Στο μοντέλο συμπεριλήφθηκε μόνο η επιδερμίδα, στην οποία δεν υπάρχουν τριχοειδή αγγεία ή μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία, και έτσι αυτό το φαινόμενο δεν εξετάστηκε.
- Ο μεταβολισμός της ένωσης μέσα στο δέρμα με χημικές αντιδράσεις, που μπορεί να οδηγήσουν σε μετατροπή της ένωσης σε άλλες ενώσεις.
- Η προσρόφηση της ένωσης στο δέρμα, και συνεπώς η φυσική δέσμευση των μορίων της ένωσης. Αυτή η διαδικασία είναι διαφορετική από την αποθήκευση μη δεσμευμένων μορίων ένωσης στον ιστό, κατά τη διάρκεια της παροδικής πρόσληψης της ένωσης. Τα δεσμευμένα μόρια θα μπορούσαν μερικές φορές να αποδεσμευτούν αργότερα και να διαχυθούν στην κυκλοφορία του αίματος. Η απορρόφηση της ένωσης στο δέρμα είναι μία από τις διαδικασίες που μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της ουσίας, η οποία είναι η ποσότητα της ένωσης που χορηγείται μέσω του δέρματος και φτάνει στη συστηματική κυκλοφορία σε αμετάβλητη κατάσταση. Η βιοδιαθεσιμότητα είναι ένα βασικό φαρμακοκινητικό χαρακτηριστικό και καθορίζεται από τις διαδικασίες της φυσικής προσρόφησης και του χημικού μεταβολισμού της ένωσης στο δέρμα.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα μελέτη, η μοντελοποίηση του δέρματος κατά τη διάχυση των index matching gels περιλαμβάνει:

- ✓ Ένα λεπτό στρώμα που αναπαριστά την επικάλυψη του index matching gel.
- ✓ Ένα στρώμα που αναπαριστά την κεράτινη στιβάδα.
- ✓ Ένα στρώμα που αναπαριστά τη βιώσιμη επιδερμίδα.

4.2.1.2. Τα Index Matching Gels που Χρησιμοποιήθηκαν

Για τη μοντελοποίηση της διάχυσης διαδερμικών συστημάτων, χρησιμοποιήθηκαν ως index matching gels, κατά τη διενέργεια του OCT, οι εξής ουσίες:

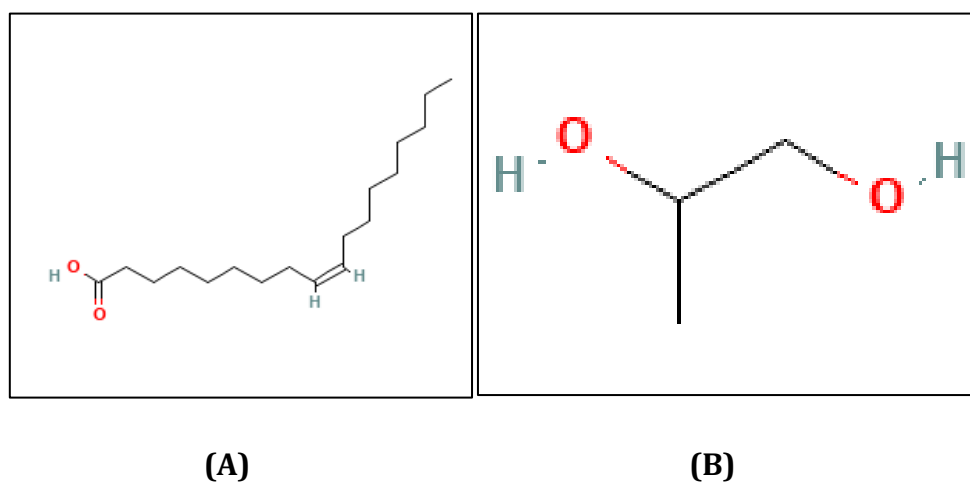
- ✓ Ελαϊκό Οξύ (OA)
- ✓ Προπυλενογλυκόλη (PG)

Οι ουσίες αυτές έχουν τις εξής ιδιότητες:

- Ελαϊκό Οξύ (OA), με τα εξής χαρακτηριστικά:
 - Μοριακό βάρος = 282.46 g/mol
 - Πυκνότητα = 0.895 g/cm³
 - Συντελεστής Διάχυσης = 4.2×10^{-10} cm²/s
 - Διαλυτότητα = 1.2×10^{-2} mg/L (Στους 20°C = 293 K)
- Προπυλενογλυκόλη (PG), με τα εξής χαρακτηριστικά:
 - Μοριακό βάρος = 76.09 g/mol
 - Πυκνότητα = 1.036 g/cm³
 - Συντελεστής Διάχυσης = 1.35×10^{-7} cm²/s
 - Διαλυτότητα = 1×10^6 mg/L (Στους 20°C = 293 °K)

Αυτές οι δύο ουσίες αποτελούν πολύ καλή επιλογή ενός index matching gel, καθώς οι συντελεστές διάθλασης τους είναι $n_{OA} = 1.46$ και $n_{PG} = 1.43$, αντίστοιχα, οι οποίοι εξισορροπούν του συντελεστές διάθλασης του αέρα ($n_{αέρα} = 1.00$) και της κεράτινης στιβάδας ($n_{sc} = 1.55$).

Το ελαϊκό οξύ ανήκει στην κατηγορία των λιπαρών οξέων και αποτελεί ταυτόχρονα υδρόφιλο και υδρόφοβο μόριο καθώς απαρτίζεται από μία υδροφοβική ουρά και ένα υδρόφιλο κεφάλι. Η προπυλενογλυκόλη κατατάσσεται στην κατηγορία των διολών και αποτελείται από δύο ομάδες υδροξυλίου (-OH), καθιστώντας το ένα έντονα υδρόφιλο μόριο [4].



Εικόνα 21 : Χημική δομή: (A) Ελαϊκό Οξύ - (B) Προπυλενογλυκόλη

Η *κεράτινη στιβάδα (stratum corneum)* είναι το επιφανειακό στρώμα του δέρματος και καθορίζει ποιες ουσίες μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό και σε τι ποσοστό. Το στρώμα αυτό, όπως αναφέρθηκε, αποτελείται από κερατινοκύτταρα, καθώς και από στρώματα λιπιδίων μέσα σε μεσοκυττάρια υδρόφιλο περιβάλλον. Το στρώμα λιπιδίων το οποίο βρίσκεται ανάμεσα από τα υδρόφιλα κερατινοκύτταρα του *stratum corneum* αποτελείται από μία υδρόφιλη και δύο λιπόφιλες περιοχές. Εξαιτίας των λιπόφιλων περιοχών, το *stratum corneum* επιτρέπει τη διείσδυση λιποδιαλυτών μορίων σε μεγαλύτερο βαθμό από υδατοδιαλυτά αντίστοιχων ενώσεων που έρχονται σε επαφή με το δέρμα, με εξαίρεση ουσίες οι οποίες έχουν εξαιρετικά υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια. Οι ουσίες αυτές λόγω της υδρόφιλης περιοχής δεν μπορούν να διαπεράσουν εύκολα το *stratum corneum* και να καταλήξουν στο στρώμα της επιδερμίδας [21].

Επίσης, είναι επιθυμητό τα διαδερμικά συστήματα τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διενέργεια του OCT να διαχέονται μέχρι τα κατώτερα στρώματα της βιώσιμης επιδερμίδας, προκειμένου να εξισορροπούν σε βάθος το συντελεστή

διάθλασης καθώς το χρήσιμο οπτικό βάθος του OCT περιορίζεται στις στιβάδες αυτές.

4.2.2. Δημιουργία του μοντέλου

Το μοντέλο μας καλείται να προσομοιάσει τη διάχυση διαδερμικών συστημάτων στην κεράτινη στιβάδα και στη βιώσιμη επιδερμίδα, προκειμένου να μελετηθεί ποιο index matching gel, το ελαϊκό οξύ ή η προπυλενογλυκόλη, αποτελεί την καταλληλότερη επιλογή για καθαρισμό του δέρματος. Όπως αναφέρθηκε, η βέλτιστη επιλογή είναι αυτή που θα έχει ως αποτέλεσμα το index matching gel να εισχωρεί και να παραμένει στην επιδερμίδα, εξισορροπώντας το συντελεστή διάθλασης μεταξύ του αέρα και της επιδερμίδας και διευκολύνοντας τη διάδοση του οπτικού φωτός εντός του ανθρώπινου σώματος.

Έτσι, για τη μελέτη του φαινομένου της διάχυσης, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο πεπερασμένων στοιχείων (Finite Element Method: FEM), που αποτελείται από τα εξής συστατικά: το index matching gel, την κεράτινη στιβάδα, τη βιώσιμη επιδερμίδα και την προσομοίωση του φαινομένου της διάχυσης.

4.2.2.1. Κατασκευή Γεωμετρίας

Σύμφωνα με τα παραπάνω, για τη δημιουργία του μοντέλου χρειάστηκαν τα εξής συστατικά στοιχεία:

- Ένα ανώτατο παραλληλόγραμμο, που προσομοιάζει το index matching gel,
- Ένα ενδιάμεσο παραλληλόγραμμο, που προσομοιάζει την κεράτινη στιβάδα,
- Ένα κατώτατο παραλληλόγραμμο, που προσομοιάζει τη βιώσιμη επιδερμίδα.

4.2.2.1.1. Παραδοχές που θεωρήθηκαν

Για την ορθή μοντελοποίηση, θεωρούμε ότι το δέρμα είναι ένα πολυφασικό υλικό. Τα πολυφασικά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μοντελοποίηση της μεταφοράς μιας διαλυμένης ουσίας και οποιουδήποτε αριθμού ουδέτερων ή φορτισμένων διαλυμένων ουσιών. Επίσης, ως πολυφασικό υλικό θεωρούμε και το index matching gel που τοποθετείται πάνω στο δέρμα, ορίζοντας κατάλληλα τις αναγκαίες παραμέτρους.

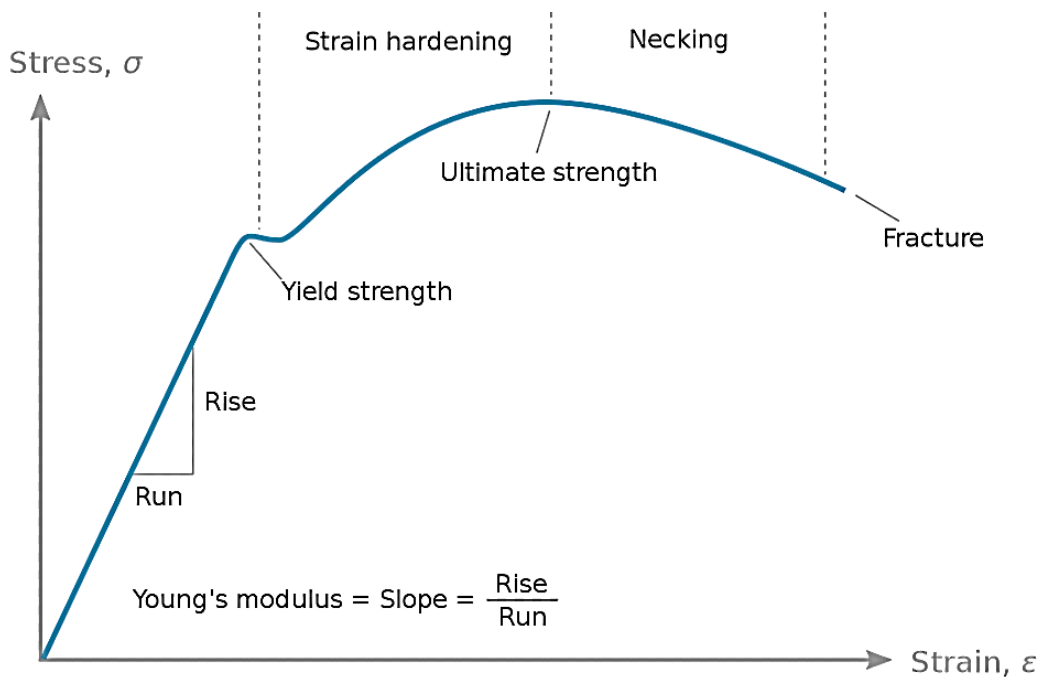
Επιπλέον, οι παράγοντες που πρέπει να οριστούν είναι οι ακόλουθοι:

- **Young's modulus:** Ο συντελεστής αυτός περιγράφει τις ελαστικές ιδιότητες ενός στερεού που υφίσταται τάση ή συμπίεση μόνο προς μία κατεύθυνση, όπως στην περίπτωση μιας μεταλλικής ράβδου που, αφού τεντωθεί ή συμπιεστεί κατά μήκος, επιστρέφει στο αρχικό της μήκος. Ο συντελεστής Young είναι ένα μέτρο της ικανότητας ενός υλικού να αντέχει τις αλλαγές κατά μήκος, όταν βρίσκεται υπό διαμήκη τάση ή συμπίεση. Μερικές φορές, αναφέρεται ως μέτρο ελαστικότητας, και είναι ίσο με τη διαμήκη τάση διαιρούμενη με την παραμόρφωση. Ο συντελεστής Young E , είναι μια μηχανική ιδιότητα που μετρά την ακαμψία εφελκυσμού ή συμπίεσης ενός στερεού υλικού. Προσδιορίζει ποσοτικά τη σχέση μεταξύ εφελκυστικής/θλιπτικής τάσης σ (δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας) και αξονικής τάσης ε (αναλογική παραμόρφωση) στη γραμμική ελαστική περιοχή ενός υλικού και προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad \text{Εξίσωση 4.2}$$

Η κεράτινη στιβάδα και η βιώσιμη επιδερμίδα του δέρματος διαθέτουν φυσικές και μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες αντιστοιχούν στις παραπάνω περιγραφείσες, όπως ελαστικότητα, εκτατικότητα, δυνατότητα στρέψης και εφελκυσμού. Επίσης, συμπεριφέρονται ως πολυφασικά υλικά, δηλαδή μπορούν να μεταβάλουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες, κατά τη διέλευση διαλυμένων ουσιών στο εσωτερικό τους. Έτσι λοιπόν, ο παραπάνω συντελεστής Young μπορεί να περιγράψει τις ελαστικές ιδιότητες της κεράτινης στιβάδας και της βιώσιμης επιδερμίδας. Για τις ανάγκες του

μοντέλου θέσαμε, με βάση τη βιβλιογραφία [26], το συντελεστή Young για τα δύο υπό μελέτη στρώματα του δέρματος ίσο με 70MPa [Διάγραμμα 6].



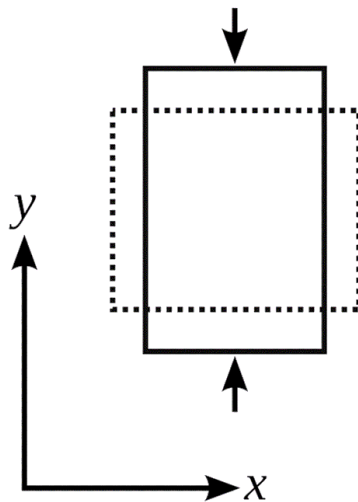
Διάγραμμα 6 Διάγραμμα Περιγραφής του Συντελεστή Young.

- **Poisson's ratio:** Ο λόγος Poisson ν (nu) είναι ένα μέτρο του φαινομένου Poisson, δηλαδή, της παραμόρφωσης (διαστολής ή συστολής) ενός υλικού, σε κατευθύνσεις κάθετες στη συγκεκριμένη κατεύθυνση φόρτισης. Η τιμή του λόγου Poisson είναι η αρνητική τιμή του λόγου της εγκάρσιας τάσης προς την αξονική τάση. Για μικρές τιμές αυτών των αλλαγών, το ν είναι το ποσό της εγκάρσιας επιμήκυνσης διαιρούμενο με το ποσό της αξονικής συμπίεσης [Εικόνα 22].

Για ένα πολυστρωματικό μέσο, όπως το δέρμα, στο οποίο κάθε στρώμα έχει διαφορετικές ελαστικές ιδιότητες, η ταχύτητα φάσης του επιφανειακού κύματος επηρεάζεται από τις μηχανικές ιδιότητες όλων των στρωμάτων που διεισδύει. Οι ελαστικές ιδιότητες που επηρεάζουν την καμπύλη διασποράς ταχύτητας φάσης περιλαμβάνουν, όχι μόνο τον συντελεστή Young, αλλά και τον λόγο Poisson, καθώς και την πυκνότητα και το πάχος κάθε στρώσης.

Η διάδοση των επιφανειακών κυμάτων σε ένα ετερογενές μέσο (στρωματοποιημένο υλικό) δείχνει μια συμπεριφορά διασποράς, όπου οι διαφορετικές συνιστώσες συχνότητας έχουν διαφορετικές ταχύτητες φάσης. Η ταχύτητα φάσης σε κάθε συχνότητα εξαρτάται από τις ελαστικές και γεωμετρικές ιδιότητες του υλικού σε διαφορετικά βάθη.

Τα περισσότερα υλικά έχουν τιμές αναλογίας Poisson που κυμαίνονται από 0.0 έως 0.5. Για την παρούσα μελέτη, με βάση σχετική βιβλιογραφία [133], θεωρούμε ότι το gel έχει τιμή 0 και η κεράτινη στιβάδα, καθώς και η βιώσιμη επιδερμίδα έχουν τιμή 0.48.



Εικόνα 22 : Περιγραφή του Συντελεστή Poisson

- **Diffusivity & Free Diffusivity:** Τα υλικά διάχυσης παρέχουν μια σχέση για τη διαχυτότητα της διαλυμένης ουσίας σε ένα πολυφασικό υλικό. Ο τανυστής διάχυσης d μπορεί να είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης παραμόρφωσης και της διαλυμένης ουσίας.

Η ελεύθερη διάχυση, από την άλλη, αντιπροσωπεύει τη διαχυτότητα, απουσία μιας στερεής μήτρας (ανταλλαγή τριβής μόνο με τη διαλυμένη ουσία).

Συνοψίζοντας, για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μοντελοποίησης και της ομαλής εκτέλεσής της, θεωρήσαμε τις εξής παραδοχές:

- Καθώς, ο στόχος μας είναι να μοντελοποιήσουμε τη διάχυση μιας διαλυμένης ουσίας σε δύο πολυφασικά υλικά (κεράτινη στιβάδα και βιώσιμη στιβάδα), η πιο απλή λύση είναι να προσομοιάσουμε το πολυφασικό υλικό ως ρευστό, και να επιλέξουμε κατάλληλες ιδιότητες στερεάς μήτρας που προσεγγίζουν τη συμπεριφορά του ρευστού.
- Συγκεκριμένα, ορίζουμε το κλάσμα στερεού όγκου (solid volume fraction) στο 0, αποστερώντας από το υλικό χαρακτηριστικά στερεού σώματος. Ακόμη, θα χρησιμοποιήσουμε μια συμπαγή μήτρα, της οποίας ο συντελεστής Young του gel είναι πολύ μικρός (1000 φορές μικρότερος) από το υποκείμενο πολυφασικό υλικό (κεράτινη στιβάδα) και του οποίου η διαπερατότητα είναι πολύ μεγαλύτερη (1000 φορές μεγαλύτερη) από το υποκείμενο πολυφασικό υλικό (κεράτινη στιβάδα).
- Οι δυνατότητες διάχυσης των διαλυμένων ουσιών πρέπει να είναι ίσες με τις ελεύθερες διαχύσεις τους, δεδομένου ότι δεν υπάρχει στερεή μήτρα που να εμποδίζει τη μεταφορά της διαλυμένης ουσίας.
- Καθώς θέλουμε το gel να αντιπροσωπεύει ένα καλά αναδευμένο διάλυμα, δηλαδή ένα διάλυμα, όπου υπάρχουν αμελητέες διαβαθμίσεις διαλυμένης ουσίας, επιλέγουμε τη διαχυτότητα της διαλυμένης ουσίας να είναι πολύ μεγάλη (1000 φορές μεγαλύτερη) από τα υποκείμενα πολυφασικά υλικά (κεράτινη στιβάδα και βιώσιμη επιδερμίδα).

4.2.2.1.2. Συνοριακές Συνθήκες

Τα πολυφασικά υλικά του *FEBioStudio* αναπτύχθηκαν για να προσομοιάσουν μια σειρά από συμπεριφορές που μπορούν να συναντηθούν σε βιολογικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της μεταφοράς διαλυμένων ουσιών και διαλυτών στο δέρμα, ωσμωτικών επιδράσεων, παραμόρφωσης στερεάς μήτρας, χημικών αντιδράσεων, κ.λπ.

Ωστόσο, στην περίπτωση μας, ενδιαφερόμαστε να πραγματοποιήσουμε τη μεταφορά διαλυμένης ουσίας, χωρίς να ανησυχούμε για αυτές τις πολύπλοκες συμπεριφορές. Πιο συγκεκριμένα, για τους σκοπούς της μελέτης μας θελήσαμε να προσομοιάσουμε τη διάχυση διαδερμικών συστημάτων (index matching gels)

για ένα άτομο 18 ετών και 75 κιλών. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε μια πολυφασική ανάλυση που μπορεί να απλοποιηθεί κατάλληλα για την ανάλυση ενός προβλήματος μεταφοράς διαλυμένης ουσίας, χωρίς πρόσθετες πολυπλοκότητες και ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

- Η *ώσμωση* είναι μια φυσική διαδικασία κατά την οποία ο διαλύτης κινείται, αυθόρμητα, μέσω μεμβράνης που είναι διαπερατή για τα μόριά του, όχι όμως και για τα μόρια της διαλυμένης ουσίας και διαχωρίζει δύο διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων ή χωρίζει ένα διαλύτη από ένα διάλυμα. Αν από την ημιπερατή μεμβράνη περνά και η διαλυμένη ουσία, τότε η διαδικασία παύει να είναι *ώσμωση* και γίνεται *διάχυση (diffusion)* μεταξύ των δύο διαλυμάτων. Έτσι, καθώς στην περίπτωση μας, θέλουμε να έχουμε φαινόμενο διάχυσης και όχι ώσμωσης, ορίσαμε την παράμετρο *osmotic_coefficient* = 0.
- Ακόμη, επιλέγουμε την οριακή συνθήκη *Fixed Displacement* για x,y,z (δηλαδή τα στοιχεία μετατόπισης x, y, z ολόκληρου του πολυφασικού τομέα είναι σταθερά και δεν κινούνται στο χώρο).

Καθορίζοντας τους βαθμούς ελευθερίας μετατόπισης και πίεσης, οι μόνοι βαθμοί ελευθερίας που παραμένουν είναι εκείνοι της διαλυμένης ουσίας ή ουσιών που ορίζονται στο πολυφασικό υλικό. Αυτό σημαίνει, ότι η υπολογιστική ανάλυση δεν επιβαρύνεται από την ανάγκη επίλυσης μετατοπίσεων στερεών ή αποτελεσματικής πίεσης ρευστού. Επιλύει μόνο τις αποτελεσματικές συγκεντρώσεις της διαλυμένης ουσίας. Ως συνήθως, για μια πολυφασική ανάλυση, εάν οι διαλυμένες ουσίες είναι ουδέτερα φορτισμένες, η αποτελεσματική συγκέντρωσή τους είναι ίδια με την πραγματική τους συγκέντρωση.

- Ομοίως, ορίζουμε την πίεση του gel στην τιμή 0, μέσω της οριακής συνθήκης *Fixed Effective Fluid Pressure*. Αυτό σημαίνει ότι ο διαλύτης δε θα ρέει για οποιοδήποτε συστατικό μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαπερατότητα του πολυφασικού υλικού (perm-const-iso).
- Επιπλέον, ορίζουμε την αρχική συγκέντρωση του index matching gel μέσω της αρχικής συνθήκης *Initial Effective Concentration*. Με βάση σχετική

βιβλιογραφία, θεωρούμε την αρχική συγκέντρωση να έχει τιμή, και για τα δύο gels, 1mg/kg/day [36]. Έτσι, η τελική τιμή της αρχικής συγκέντρωσης θα είναι 75 mg (καθώς θεωρούμε το υπό μελέτη άτομο 75 κιλά).

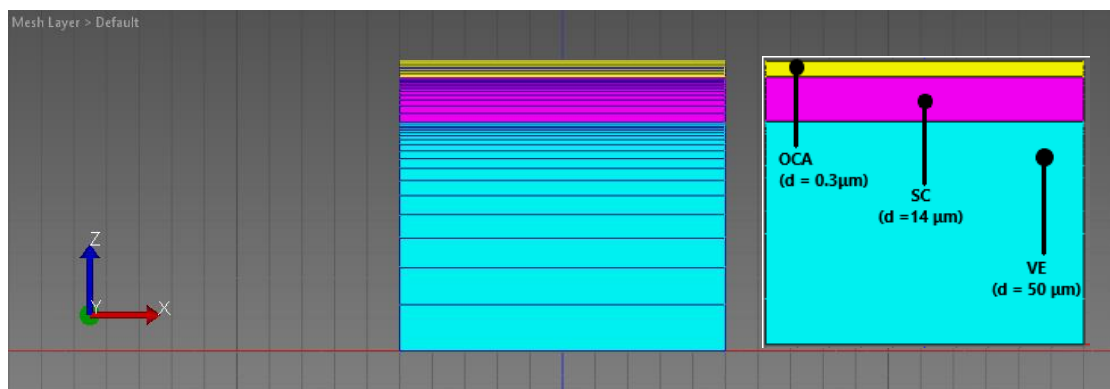
- Όσον αφορά, το πάχος της κεράτινης στιβάδας αυξάνει με βάση την ηλικία σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο [6]:

$$d_{sc} = (0.125 \times A + 11.8) \times 10^{-6} \text{ (m)} \quad \text{Εξίσωση 4.7}$$

Επομένως, το στρώμα της κεράτινης στιβάδας θα έχει πάχος $\sim 14 \mu\text{m}$, όπως προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση. Το πάχος της βιώσιμης επιδερμίδας θα είναι περίπου 3-5 φορές μεγαλύτερο από αυτό της κεράτινης στιβάδας ($50 \mu\text{m}$). Τέλος, το πάχος του OCA (index matching gel) ορίζεται αρκετά μικρότερο από τα δύο παραπάνω στρώματα, προκειμένου να θεωρηθεί, όσο γίνεται πιο επιφανειακή η χορήγηση του ($0.3 \mu\text{m}$).

- Τέλος, ορίζουμε τα timesteps για τα οποία θέλουμε να μελετήσουμε το φαινόμενο καθώς επίσης και το step size σε 7000 timesteps και 0.1 αντίστοιχα. Αυτά τα timesteps θα αναλογούν σε 15 λεπτά πραγματικού χρόνου.

Έπειτα από την εφαρμογή όλων των παραπάνω, το τελικό μοντέλο διαμορφώνεται όπως στην παρακάτω Εικόνα 23, όπου το άνω στρώμα (κίτρινο) αναπαριστά το στρώμα του gel, το ενδιάμεσο (μωβ) την κεράτινη στιβάδα και το κάτω στρώμα (θαλασσί) αναπαριστά τη βιώσιμη επιδερμίδα:



Εικόνα 23 : Αναπαράσταση του Τελικού Ολοκληρωμένου Μοντέλου

Αποτελέσματα της Μελέτης

Μετά τη μεταγλώττιση του προγράμματος, ακολουθεί η μελέτη των αποτελεσμάτων. Η μελέτη αυτή ελέγχει τη σωστή λειτουργία του μοντέλου, καθώς επίσης και την χρονο-εξάρτηση διάφορων μεγεθών, όπως η ροή και η συγκέντρωση της ένωσης (gel), που έχει επαλειφθεί στην επιδερμίδα.

Μέσω της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων μπορέσαμε να εξαγάγουμε γραφικές παραστάσεις και τα αντίστοιχα στιγμιότυπα, προκειμένου να μελετήσουμε σε ποιο βάθος σταθεροποιείται η συγκέντρωση, τόσο του ελαϊκού οξέος, όσο και της προπυλενογλυκόλης. Οι ληφθείσες παραστάσεις-στιγμιότυπα αναπαριστούν τα ακόλουθα:

- Συγκέντρωση Διαλυμένης Ουσίας - Χρόνος
- Συνολική Ροή Διαλυμένης Ουσίας - Χρόνος
- Συγκέντρωση Διαλυμένης Ουσίας - Θέση στον άξονα z
- Συνολική Ροή Διαλυμένης Ουσίας - Θέση στον άξονα z
- Στιγμιότυπα του Μοντέλου

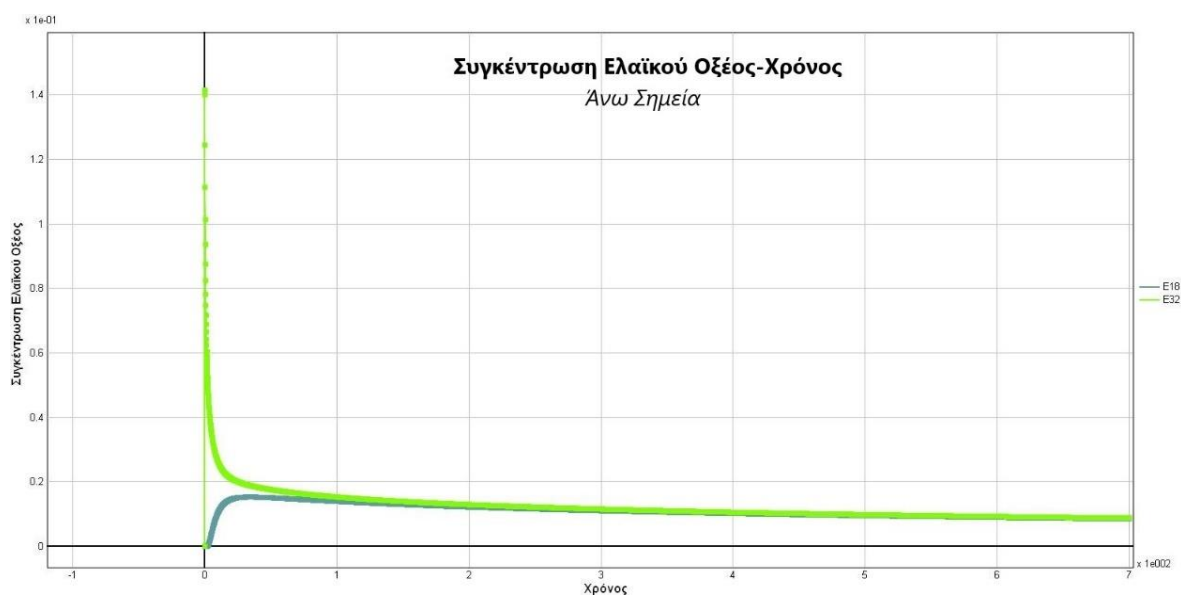
Πιο συγκεκριμένα, κατά την έρευνα μας, εξετάσαμε και αναλύσαμε τα εξής:

5.1. Συγκέντρωση του Index Matching Gel σε Συνάρτηση με τον Χρόνο

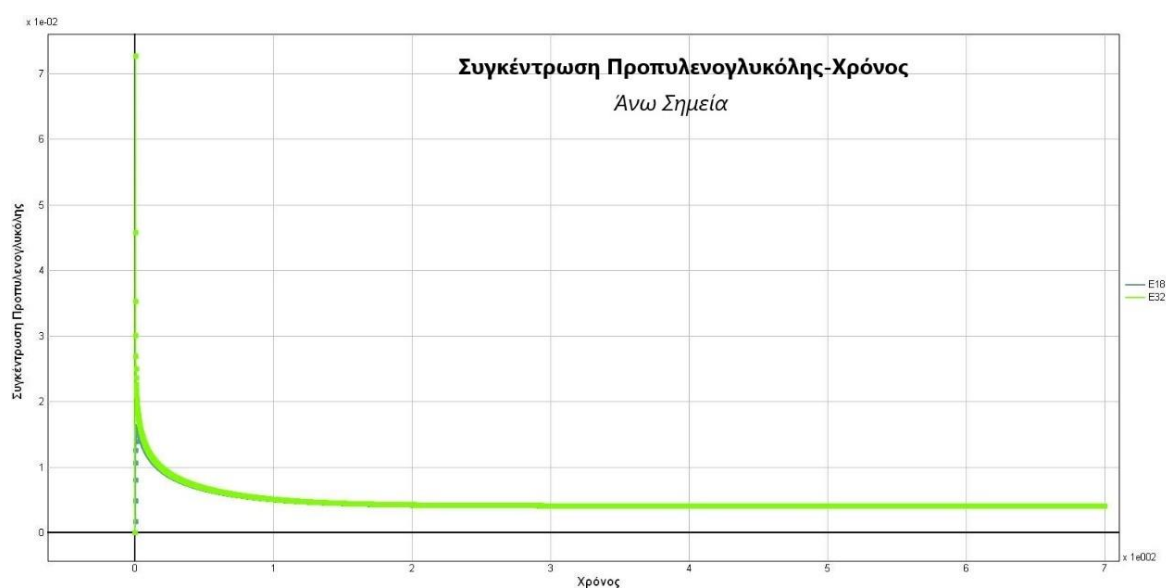
5.1.1. Μελέτη Μεταβολής της Συγκέντρωσης σε Συνάρτηση με το Χρόνο

❖ Άνω σημείο Κεράτινης Στιβάδας – Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας

Αρχικά, μελετήσαμε τη συμπεριφορά της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο.



Διάγραμμα 7 : Συγκέντρωση Ελαϊκού Οξέος – Χρόνος [Άνω Σημεία]



Διάγραμμα 8: Συγκέντρωση Προπυλενογλυκόλης – Χρόνος [Άνω Σημεία]

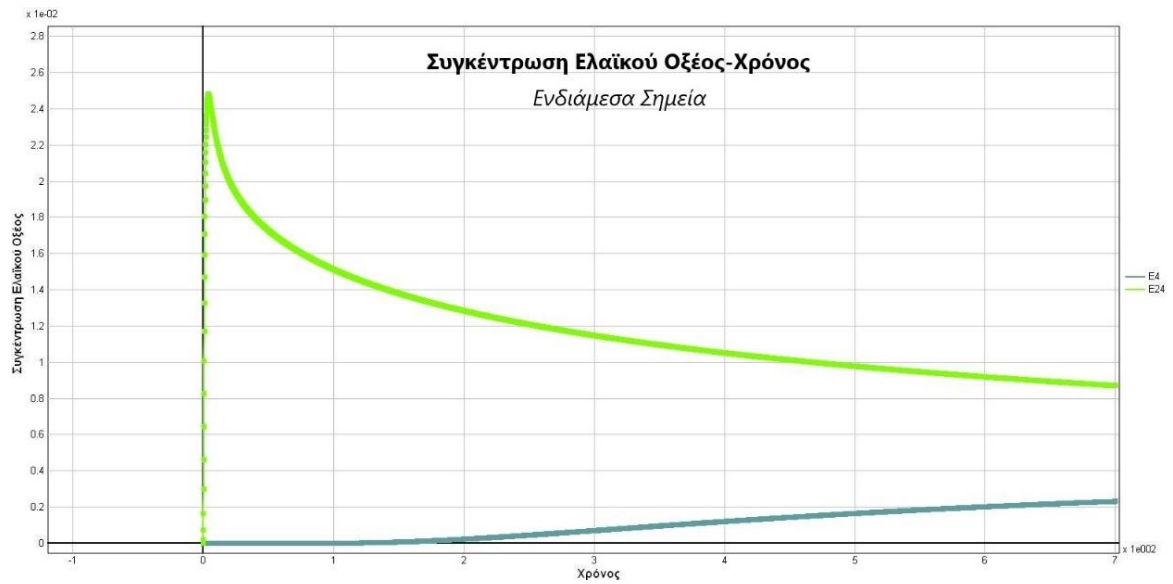
Για την ανάλυση, επελέγησαν 2 σημεία, το πρώτο στην επιφάνεια της κεράτινης στιβάδας (E32) και το δεύτερο σημείο (E18) στο ανώτερο μέρος της βιώσιμης επιδερμίδας, τόσο για το ελαϊκό οξύ, όσο και για την προπυλενογλυκόλη.

Η μορφή των παραπάνω γραφικών παραστάσεων είναι η αναμενόμενη, τόσο για το OA όσο και για την PG. Παρατηρούμε ότι και στα δύο στρώματα, αρχικά, η συγκέντρωση αυξάνεται εκθετικά μέχρι να φτάσει σε μία μέγιστη τιμή και έπειτα μειώνεται εκθετικά, τείνοντας να σταθεροποιηθεί. Επίσης, για το ανώτερο σημείο (E32 – κεράτινη στιβάδα), καθώς αυτό δέχεται πρώτο την ένωση, θα έχουμε ταχύτερη μεταβολή της συγκέντρωσης. Για το κατώτερο σημείο (E18 – βιώσιμη επιδερμίδα), θα έχουμε βραδύτερη μεταβολή, μέχρι να εξισορροπηθεί με τη συγκέντρωση του παραπάνω στρώματος.

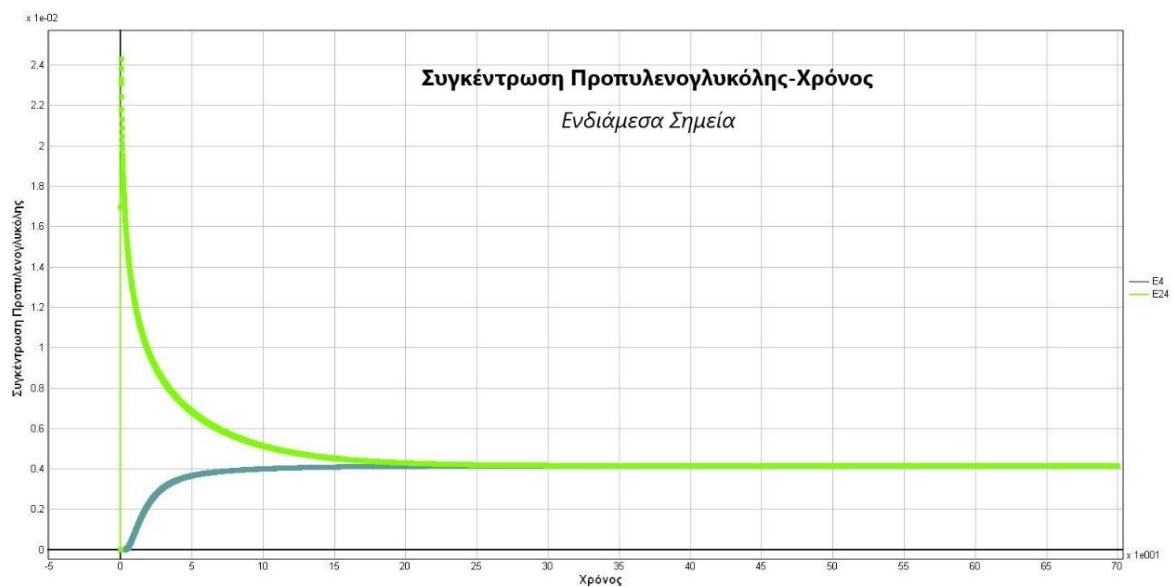
Όσον αφορά την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης και τη σταθεροποίησή της, μεταξύ του άνω σημείου της κεράτινης στιβάδας και του άνω σημείου της βιώσιμης επιδερμίδας, για το ελαϊκό οξύ, κατά τη διάρκεια του φαινομένου, παρατηρούμε ότι πραγματοποιείται για χρόνο προσομοίωσης $t = 300$ timesteps, ο οποίος αντιστοιχεί σε πραγματικό χρόνο $t = 6.43$ min. Για την προπυλενογλυκόλη αντίστοιχα, η συγκέντρωση σταθεροποιείται για $t = 200$ timesteps, που αναλογεί σε πραγματικό χρόνο $t = 4.29$ min.

❖ ***Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας - Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας***

Κατόπιν, μελετήσαμε τη συμπεριφορά της συγκέντρωσης σε σχέση με το χρόνο, τόσο για το ελαϊκό οξύ, όσο και για την προπυλενογλυκόλη, στο ενδιάμεσο σημείο κάθε στιβάδας. Τα σημεία που επελέγησαν για την κεράτινη στιβάδα είναι το E24, ενώ για τη βιώσιμη επιδερμίδα είναι το E4.



Διάγραμμα 9: Συγκέντρωση Ελαϊκού Οξέος – Χρόνος [Ενδιάμεσα Σημεία]



Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση Προπυλενογλυκόλης – Χρόνος [Ενδιάμεσα Σημεία]

Όσον αφορά το OA, στην κεράτινη στιβάδα, αρχικά η συγκέντρωση αυξάνει εκθετικά μέχρι να φτάσει σε μία μέγιστη τιμή και έπειτα μειώνεται εκθετικά, τείνοντας να σταθεροποιηθεί. Για την βιώσιμη επιδερμίδα, η συγκέντρωση βαίνει συνεχώς αυξανόμενη, αλλά διατηρεί χαμηλότερη τιμή, όπως είναι αναμενόμενο, καθώς δεν φτάνει μεγάλη ποσότητα ελαϊκού οξέος μέχρι εκεί.

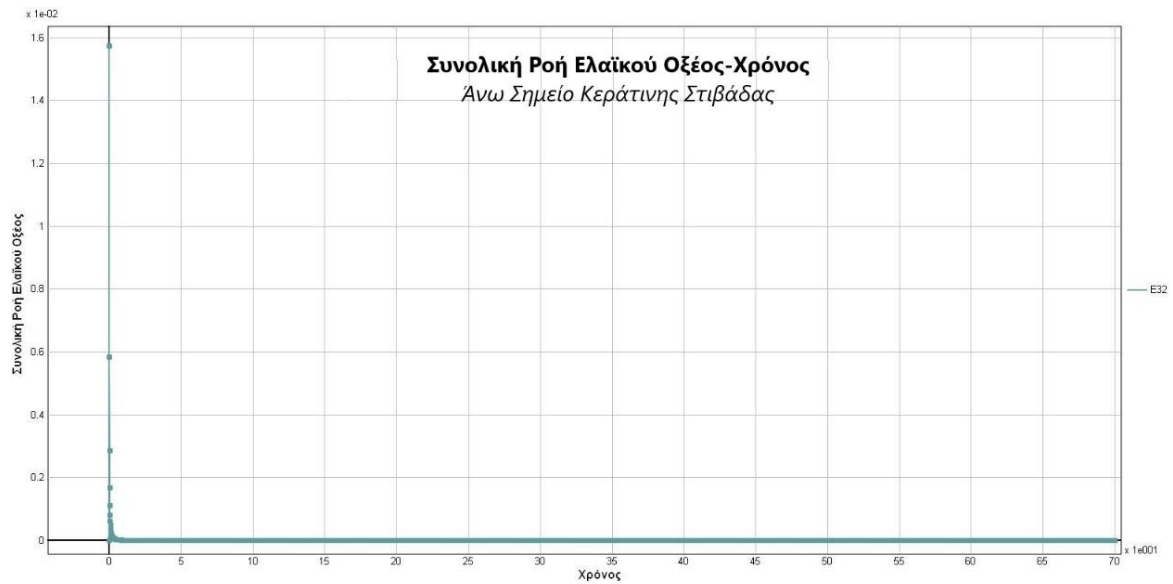
Όσον αφορά την PG, και για τα δύο στρώματα αρχικά η συγκέντρωση αυξάνει εκθετικά μέχρι να φτάσει σε μία μέγιστη τιμή και έπειτα, όσον αφορά την κεράτινη στιβάδα, μειώνεται εκθετικά, ενώ για τη βιώσιμη επιδερμίδα σταθεροποιείται στη μέγιστη τιμή, η οποία, κάποια στιγμή, ταυτίζεται με αυτήν της κεράτινης στιβάδας. Επίσης, τόσο για το OA, όσο και για την PG για το ανώτερο σημείο (E24 - κεράτινη στιβάδα), θα έχουμε ταχύτερη μεταβολή της συγκέντρωσης, καθώς αυτό δέχεται πρώτο την ένωση. Για το κατώτερο σημείο (E4 - βιώσιμη επιδερμίδα), θα έχουμε βραδύτερη μεταβολή της συγκέντρωσης της PG, μέχρι να εξισορροπηθεί με τη συγκέντρωση του παραπάνω στρώματος.

Για το ελαϊκό οξύ δεν επιτυγχάνεται εξισορρόπηση και σταθεροποίησή της συγκέντρωσης, μεταξύ του ενδιάμεσου σημείου της κεράτινης στιβάδας και του ενδιάμεσου σημείου της βιώσιμης επιδερμίδας, κατά τη διάρκεια του φαινομένου, καθώς, δε φτάνει επαρκής ποσότητα OA στο ενδιάμεσο αυτό σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας. Για την προπυλενογλυκόλη από την άλλη, η συγκέντρωση σταθεροποιείται για $t = 300$ timesteps, ο οποίος αναλογεί σε πραγματικό χρόνο $t = 6.43$ min.

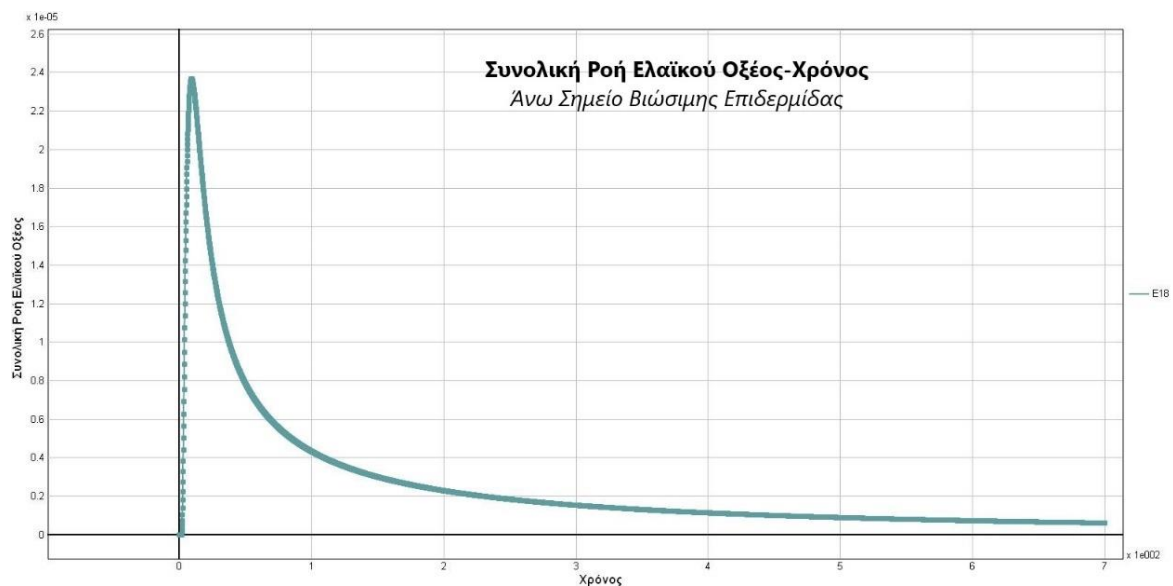
5.1.2. Μελέτη Μεταβολής της Συνολικής Ροής σε Συνάρτηση με τον Χρόνο

❖ *Ανω σημείο Κεράτινης Στιβάδας - Ανω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας*

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τη συμπεριφορά της συνολικής ροής σε σχέση με το χρόνο. Για το σκοπό αυτό, επελέγησαν πάλι, τα 2 ίδια σημεία, το πρώτο στην επιφάνεια της κεράτινης στιβάδας (E32) και το δεύτερο σημείο (E18) στο ανώτερο μέρος της βιώσιμης επιδερμίδας, τόσο για το ελαϊκό οξύ όσο και για την προπυλενογλυκόλη.

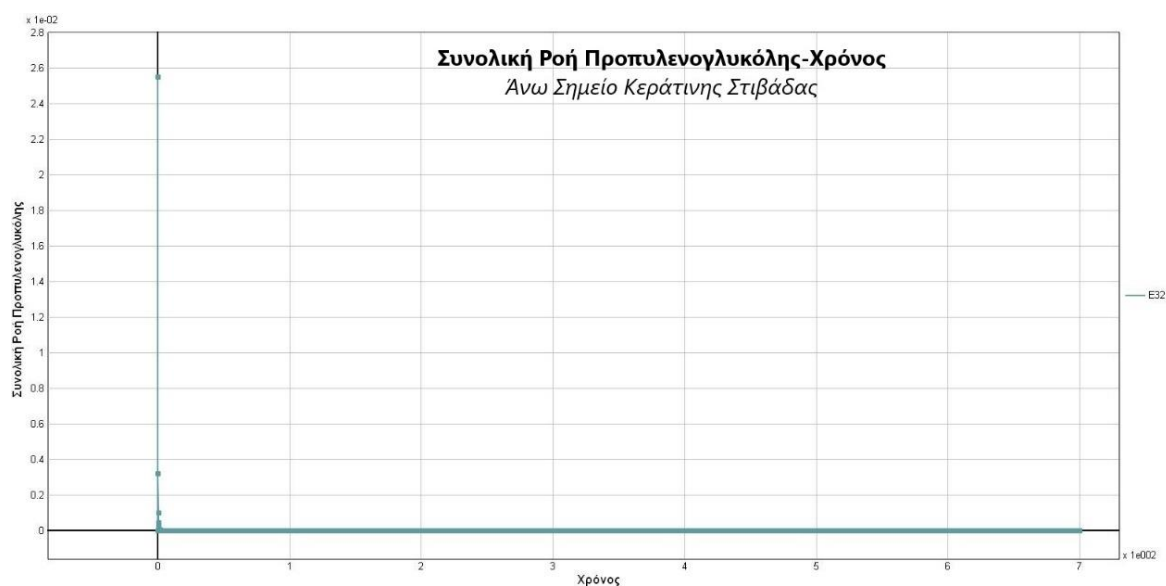


Διάγραμμα 11: Συνολική Ροή Ελαϊκού Οξέος -Χρόνος [Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]

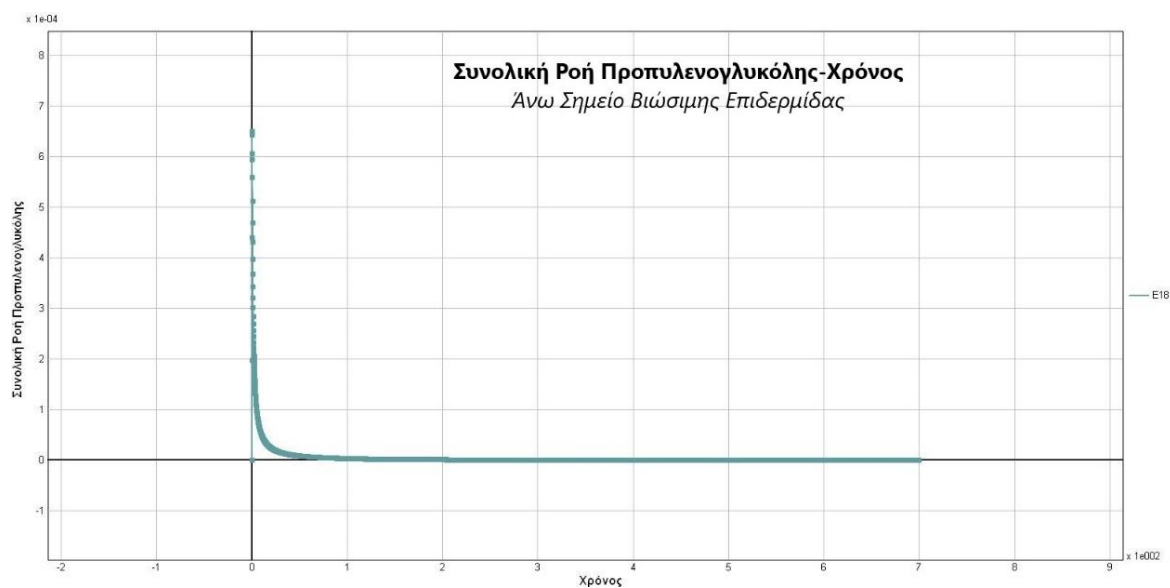


Διάγραμμα 12: Συνολική Ροή Ελαϊκού Οξέος -Χρόνος [Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας]

Για το OA, στην κεράτινη στιβάδα, αρχικά η συνολική ροή αυξάνει ραγδαία και εκθετικά για το άνω σημείο της κεράτινης στιβάδας και έπειτα μειώνεται εκθετικά, τείνοντας να μηδενιστεί. Για την βιώσιμη επιδερμίδα, η συνολική ροή αυξάνεται, και αυτή εκθετικά, αλλά με πιο αργό ρυθμό από ότι το άνω σημείο της κεράτινης στιβάδας και με σαφώς χαμηλότερη μέγιστη τιμή (1000 φορές μικρότερη), από ότι στην κεράτινη στιβάδα, στη συνέχεια δε, μειώνεται εκθετικά.



Διάγραμμα 13: Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος
[Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]



Διάγραμμα 14: Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος
[Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας]

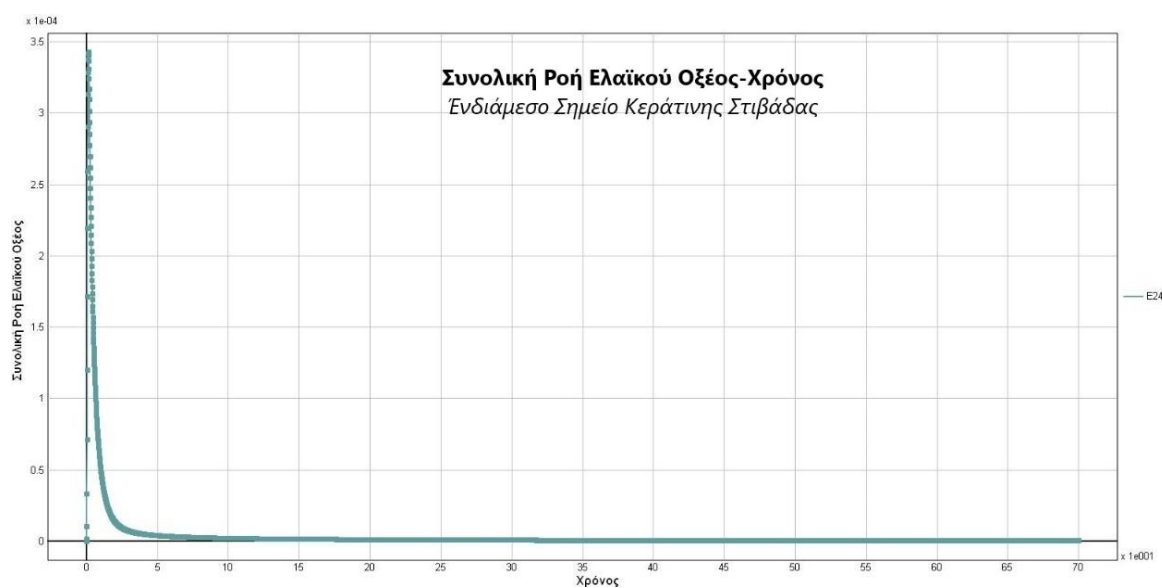
Όσον αφορά την PG, και για τα δύο στρώματα αρχικά η συγκέντρωση αυξάνει εκθετικά μέχρι να φτάσει σε μία μέγιστη τιμή και έπειτα μειώνεται εκθετικά μέχρι να μηδενιστεί. Τόσο για το OA, όσο και για την PG, στο ανώτερο σημείο (E24 - κεράτινη στιβάδα), παρατηρείται ταχύτερη μεταβολή, κατά την αύξηση

και μείωση της ροής, καθώς το σημείο αυτό δέχεται πρώτο την ένωση και έτσι σε εκείνο το σημείο η ένωση θα ρέει με ταχύτερο ρυθμό. Για το κατώτερο σημείο (E4 – βιώσιμη επιδερμίδα), θα παρατηρηθεί σχετικά βραδύτερη μεταβολή της ροής, σε σχέση με την κεράτινη στιβάδα, μέχρι να μηδενιστεί.

Συγκρίνοντας την PG και το OA, για το άνω σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, ο ρυθμός αύξησης και μείωσης της ροής της PG είναι μεγαλύτερος, σε σχέση με το OA, καθώς, στην PG, η ροή είναι πιο έντονη, λόγω του μεγαλύτερου συντελεστή διάχυσης και έτσι, η ουσία φτάνει πιο γρήγορα στο άνω σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, σε σχέση με το OA, όπως φαίνεται και από την κλίση των Διαγραμμάτων 7,8, βέβαια με χαμηλότερη μέγιστη τιμή (100 φορές μικρότερη), από ότι το OA.

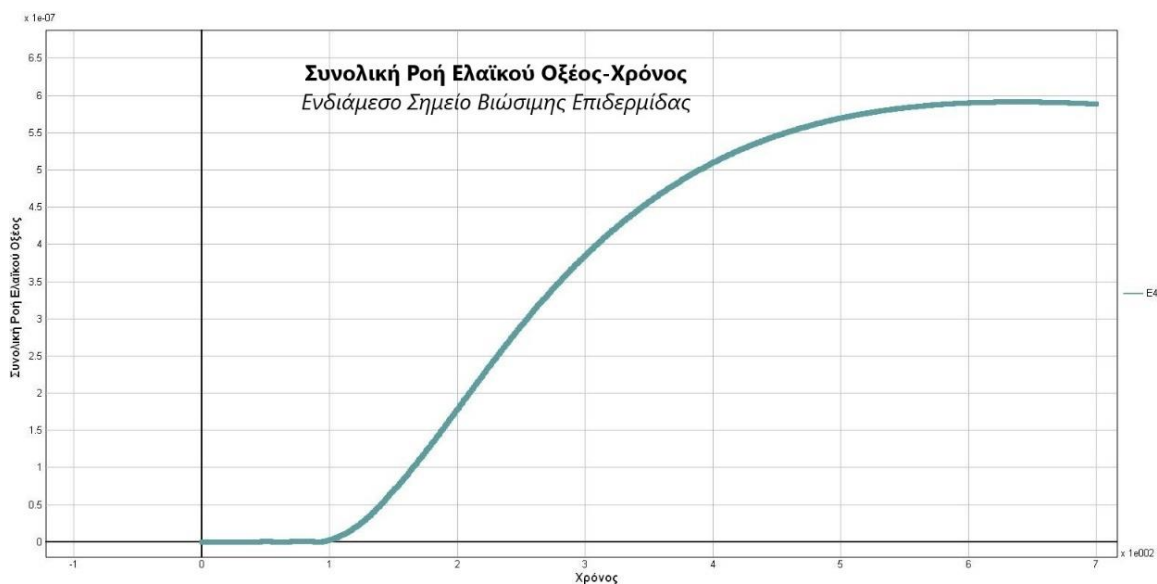
❖ **Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας - Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας**

Κατόπιν, μελετήσαμε τη συμπεριφορά της συνολικής ροής σε σχέση με το χρόνο, τόσο για το ελαϊκό οξύ όσο και για την προπυλενογλυκόλη, στο ενδιάμεσο σημείο κάθε στιβάδας. Τα σημεία που επελέγησαν για την κεράτινη στιβάδα είναι το E24, ενώ για τη βιώσιμη επιδερμίδα είναι το E4.



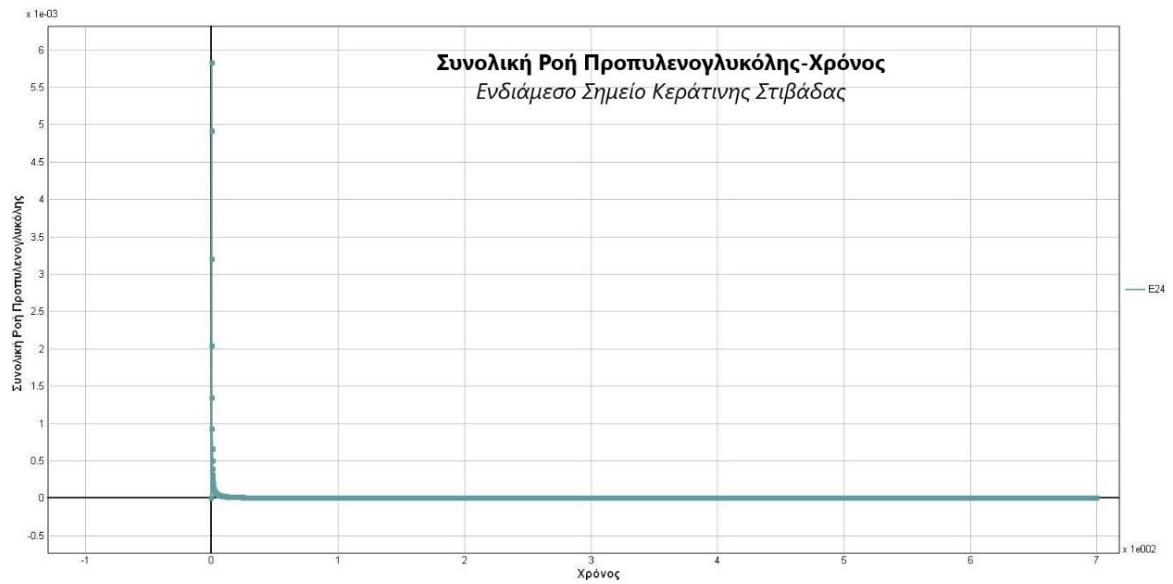
Διάγραμμα 15: Συνολική Ροή Ελαϊκού -Χρόνος [Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]

Όσον αφορά το OA, στο ενδιάμεσο σημείο της κεράτινης στιβάδας, η ροή θα μεταβάλλεται εκθετικά μέχρι να φτάσει σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια θα μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί.

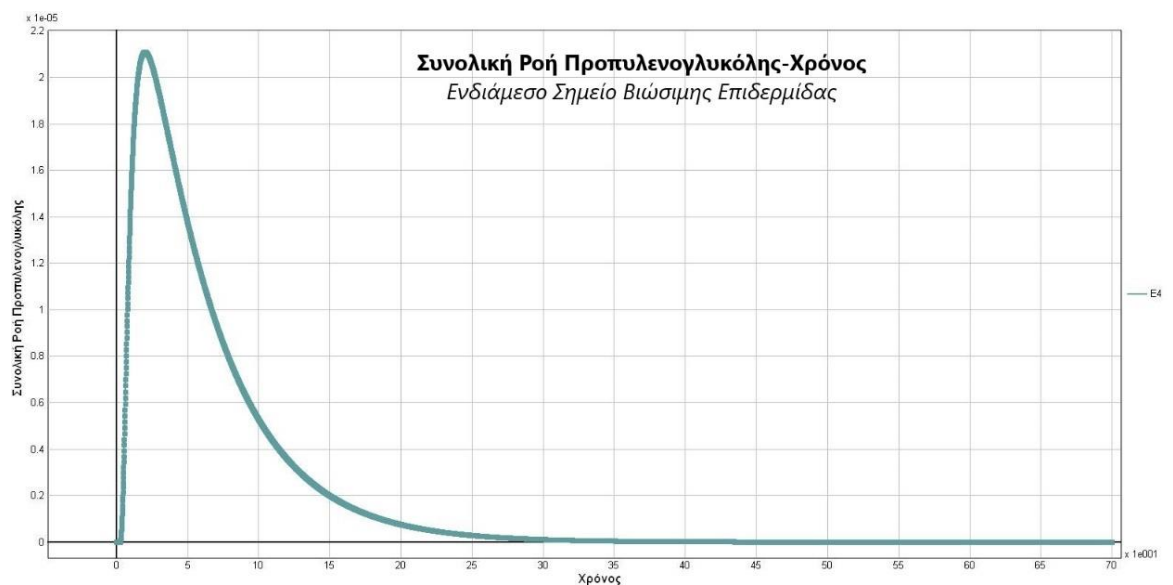


Διάγραμμα 16: Συνολική Ροή Ελαϊκού -Χρόνος [Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας]

Για το ενδιάμεσο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, η ροή του OA θα αυξάνεται εκθετικά, μέχρι να φτάσει σε μια μέγιστη τιμή, όπου θα σταθεροποιηθεί. Αξίζει να παρατηρήσουμε, ότι η μέγιστη τιμή της ροής, στο ενδιάμεσο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, είναι πολύ μικρότερη από τη μέγιστη τιμή στο αντίστοιχο σημείο της κεράτινης στιβάδας (1000 φορές μικρότερη), οπότε μιλάμε για αμελητέα διάχυση του OA στη βιώσιμη επιδερμίδα.



Διάγραμμα 17: Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος
[Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας]



Διάγραμμα 18: Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης -Χρόνος
[Ενδιάμεσο Σημείο βιώσιμης Επιδερμίδας]

Όσον αφορά την PG, στο ενδιάμεσο σημείο της κεράτινης στιβάδας και της βιώσιμης επιδερμίδας, ο ρυθμός μεταβολής είναι πιο έντονος στην κεράτινη στιβάδα, από ότι στη βιώσιμη επιδερμίδα. Και εδώ επίσης, η μέγιστη τιμή της ροής, στη βιώσιμη επιδερμίδα, θα είναι μικρότερη (100 φορές), από ότι στην κεράτινη στιβάδα. Επίσης, τόσο για το OA, όσο και για την PG για το ενδιάμεσο σημείο (E24 - κεράτινη στιβάδα), θα έχουμε πιο έντονη μεταβολή της ροής,

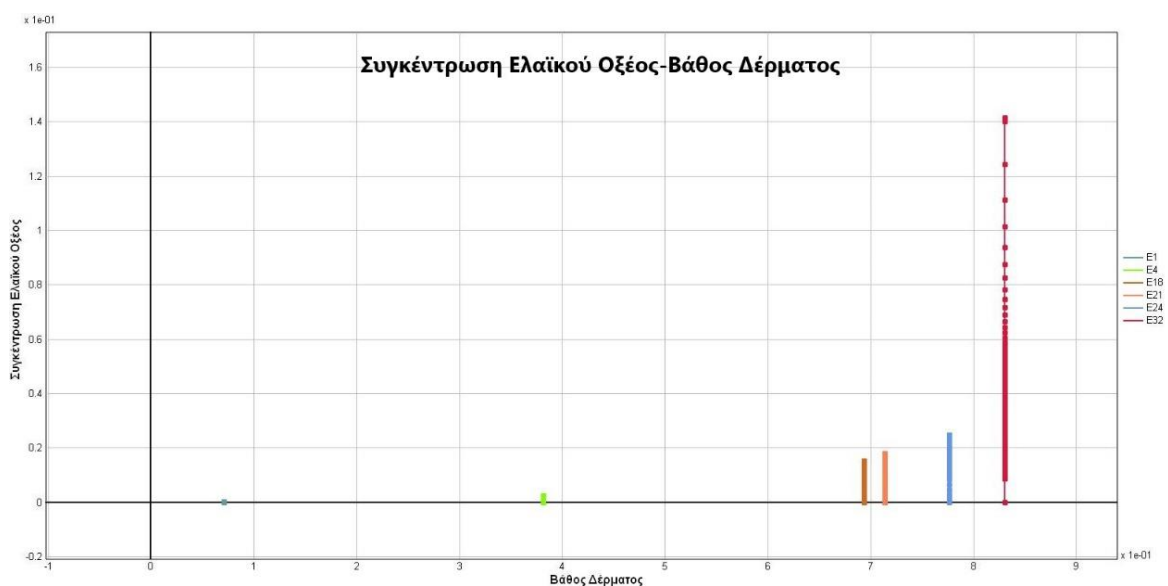
καθώς αυτό δέχεται πρώτο την ένωση και έτσι σε εκείνο το σημείο θα ρέει με μεγαλύτερο ρυθμό ενώ, για το ενδιάμεσο σημείο (E4 – βιώσιμη επιδερμίδα), η μεταβολή της ροής είναι πιο αργή.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι, η συνολική ροή του OA και της PG, μηδενίζεται τη χρονική στιγμή, κατά την οποία σταθεροποιείται και εξισορροπείται η συγκέντρωση μεταξύ των σημείων της κεράτινης στιβάδας και εκείνων της βιώσιμης επιδερμίδας. Εξαίρεση σε αυτή την παρατήρηση, και μόνο για το OA, αποτελούν τα ενδιάμεσα σημεία της κεράτινης στιβάδας και της βιώσιμης επιδερμίδας, για τα οποία δεν έχει επέλθει εξισορρόπηση συγκεντρώσεων και επομένως, δεν υπάρχει μηδενισμός της ροής, καθώς το OA δεν έχει φτάσει, στο σημείο εκείνο, στην τιμή σταθεροποίησης της συγκέντρωσης.

5.1.3. Μελέτη Μεταβολής της Συγκέντρωσης σε Συνάρτηση με τη Θέση στον Άξονα Z

❖ Κεράτινη Στιβάδα – Βιώσιμη Επιδερμίδα

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τη συμπεριφορά της συγκέντρωσης σε σχέση με τη θέση στον άξονα Z (βάθος δέρματος).

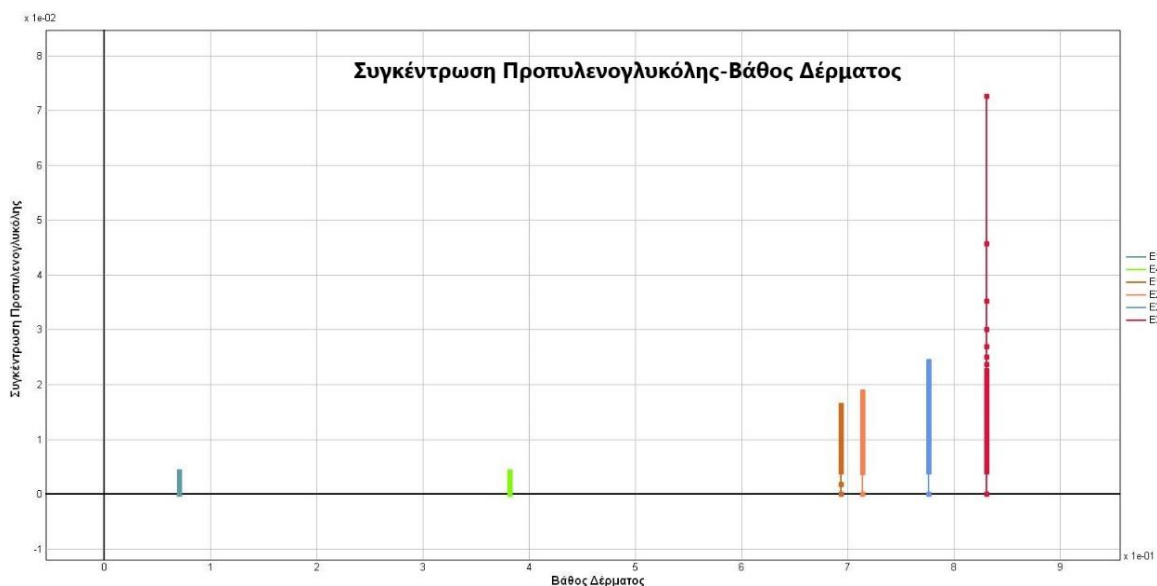


Διάγραμμα 19: Συγκέντρωση Ελαϊκού Οξέος – Θέση στον Άξονα Z

Για το σκοπό αυτό, επελέγησαν 6 σημεία, τα τρία πρώτα στην κεράτινη στιβάδα (E21: Κάτω σημείο, E24: Ενδιάμεσο σημείο, E32: Πάνω Σημείο) και τρία επόμενα στην βιώσιμη επιδερμίδα (E1: Κάτω σημείο, E4: Ενδιάμεσο σημείο, E18: Πάνω σημείο), τόσο για το ελαϊκό οξύ (OA) όσο και για την προπυλενογλυκόλη (PG).

Η μορφή των γραφικών παραστάσεων είναι η αναμενόμενη, τόσο για το OA όσο και για την PG, με τη συγκέντρωση να βαίνει συνεχώς μειούμενη, από το επάνω σημείο της κεράτινης στιβάδας, μέχρι το κάτω σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας (Στα διαγράμματα από δεξιά προς τα αριστερά).

Για το OA, στα σημεία που βρίσκονται στην κεράτινη στιβάδα (E21, E24, E32) η συγκέντρωση κατά την πορεία της ουσίας στον άξονα Z έχει μεγαλύτερη τιμή από ότι η συγκέντρωση των αντίστοιχων σημείων που βρίσκονται στην βιώσιμη επιδερμίδα (E1, E4, E18). Μάλιστα, στο ενδιάμεσο και κατώτατο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, η συγκέντρωση είναι πρακτικά μηδέν (0), πράγμα που σημαίνει ότι η διάχυση του OA στη βιώσιμη επιδερμίδα είναι μηδαμινή.



Διάγραμμα 20: Συγκέντρωση Προπυλενογλυκόλης - Θέση στον Άξονα Z

Για την PG, στην κεράτινη στιβάδα (E21, E24, E32) ακολουθείται το ίδιο μοτίβο μεταβολής, ενώ στη βιώσιμη επιδερμίδα, θα έχουμε σε όλα τα σημεία της (E1, E4, E18), μη μηδενικές τιμές της συγκέντρωσης, πράγμα που

υποδηλώνει, ότι η PG θα φτάνει μέχρι το κατώτατο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας.

Κατόπιν, μελετήσαμε την ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης, μεταξύ των ακραίων σημείων, τόσο της κεράτινης στιβάδας, όσο και της βιώσιμης επιδερμίδας. Για το OA, στην κεράτινη στιβάδα, το ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης ισούται με -82% , ενώ και στη βιώσιμη επιδερμίδα, ισούται με -99% , πράγμα που σημαίνει ότι πρακτικά μηδενίζεται. Για την PG, στην κεράτινη στιβάδα, παρατηρείται το ίδιο ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης που ισούται με -75% , τόσο στην κεράτινη στιβάδα, όσο και στη βιώσιμη επιδερμίδα. Από τις παραπάνω μεταβολές συγκέντρωσης, μπορούμε να συμπεράνουμε, ακόμη μια φορά, ότι το OA συγκεντρώνεται, κυρίως, στην κεράτινη στιβάδα και αμελητέα ποσότητα στη βιώσιμη επιδερμίδα. Από την άλλη, για την PG, η συγκέντρωση που παραμένει στην κεράτινη στιβάδα, και αυτή που διαχέεται στη βιώσιμη επιδερμίδα είναι σαφώς μεγαλύτερη, σε σχέση με το OA.

❖ **Συγκέντρωση ανά Ζεύγη : Κεράτινη Στιβάδα - Βιώσιμη Επιδερμίδα**

Χρήσιμη αποδείχθηκε και η μελέτη της ποσοστιαίας μεταβολής της συγκέντρωσης, για τις δύο ουσίες, μεταξύ των ζευγών σημείων: Άνω σημείο κεράτινης στιβάδας - Άνω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας, Ενδιάμεσο σημείο κεράτινης στιβάδας - Ενδιάμεσο σημείο βιώσιμης επιδερμίδας, Κάτω σημείο κεράτινης στιβάδας - Κάτω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας. Έτσι, οδηγηθήκαμε στα εξής αποτελέσματα:

- **Ελαϊκό οξύ**
 - Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -84% .
 - Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -90% .
 - Κάτω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Κάτω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -99% .

- **Προπυλενογλυκόλη**
 - *Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας:* Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι –79%.
 - *Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας:* Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι –83%.
 - *Κάτω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Κάτω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας:* Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι –96%.

Οι παραπάνω μεταβολές δείχνουν ότι, τόσο για το OA, όσο και για την PG, οι συγκεντρώσεις στη βιώσιμη επιδερμίδα είναι χαμηλότερες από αυτές στην κεράτινη στιβάδα. Από την άλλη, η μείωση στη βιώσιμη επιδερμίδα, είναι μεγαλύτερη για το OA, από ότι για την PG.

❖ **Σχέση Συγκέντρωσης PG/OA κατά τον Κατακόρυφο Άξονα Z**

Τέλος, μελετήσαμε τη ποσοστιαία σχέση της συγκέντρωσης της προπυλενογλυκόλης προς το ελαϊκό οξύ (PG/OA) για τα συγκεκριμένα σημεία (βάθη δέρματος), για την διάχυση της κάθε χημικής ένωσης κατά τον κατακόρυφο άξονα Z. Τα υπό μελέτη σημεία για την κεράτινη στιβάδα είναι τα εξής: E21: Κάτω σημείο, E24: Ενδιάμεσο σημείο, E32: Πάνω Σημείο και για τη βιώσιμη επιδερμίδα τα εξής: E1: Κάτω σημείο, E4: Ενδιάμεσο σημείο, E18: Πάνω σημείο. Μετά τη μελέτη των γραφικών παραστάσεων οδηγηθήκαμε στα εξής συμπεράσματα:

- *Για το E32 (Επιφάνεια κεράτινης στιβάδας-0μm βάθος δέρματος):* Το ποσοστό της συγκέντρωσης της PG σε σχέση με το OA είναι 51%. Αυτό σημαίνει ότι στην επιφάνεια της κεράτινης στιβάδας συγκεντρώνεται η μισή ποσότητα PG, σε σχέση με το OA.
- *Για το E24 (Ενδιάμεσο σημείο κεράτινης στιβάδας-7μm βάθος δέρματος):* Το ποσοστό της συγκέντρωσης της PG σε σχέση με το OA είναι 100%. Αυτό σημαίνει ότι στο μέσο της κεράτινης στιβάδας συγκεντρώνεται ακριβώς η ίδια ποσότητα PG σε σχέση με το OA.
- *Για το E21 (Κάτω σημείο κεράτινης στιβάδας-14μm βάθος δέρματος):* Το ποσοστό της συγκέντρωσης της PG σε σχέση με το OA είναι 105%. Αυτό

σημαίνει ότι στο κάτω μέρος της κεράτινης στιβάδας συγκεντρώνεται λίγη παραπάνω ποσότητα PG σε σχέση με το OA.

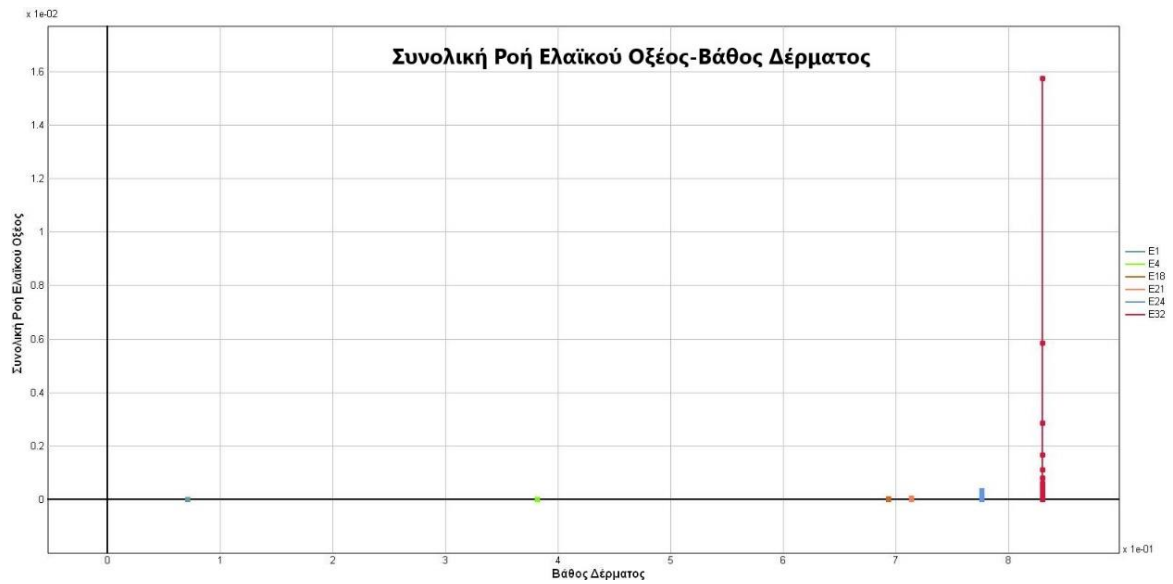
- Για το E18 (Επιφάνεια βιώσιμης επιδερμίδας-14μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συγκέντρωσης της PG σε σχέση με το OA είναι 106%. Πρόκειται ουσιαστικά, για το ίδιο σημείο, και γιαυτό οι τιμές είναι παρόμοιες.
- Για το E4 (Ενδιάμεσο σημείο βιώσιμης επιδερμίδας-39μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συγκέντρωσης της PG σε σχέση με το OA είναι 200%. Αυτό σημαίνει ότι στο μέσο της βιώσιμης επιδερμίδας συγκεντρώνεται διπλάσια ποσότητα PG σε σχέση με το OA, γεγονός αναμενόμενο καθώς η PG διαχέεται βαθύτερα σε σχέση με το OA.
- Για το E1 (Κάτω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας-64μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συγκέντρωσης της PG σε σχέση με το OA είναι 4000%. Αυτό σημαίνει ότι στο κάτω μέρος της βιώσιμης επιδερμίδας συγκεντρώνεται 40 φορές περισσότερη ποσότητα PG σε σχέση με το OA, γεγονός αναμενόμενο καθώς η PG φτάνει μέχρι το τέλος της βιώσιμης επιδερμίδας, ενώ η ποσότητα του OA είναι αμελητέα (παρονομαστής πολύ μικρός).

Επομένως, παρατηρούμε ότι όσο βαθύτερα διεισδύουμε στη βιώσιμη επιδερμίδα, θα συγκεντρώνεται προπυλενογλυκόλη και όχι ελαϊκό οξύ.

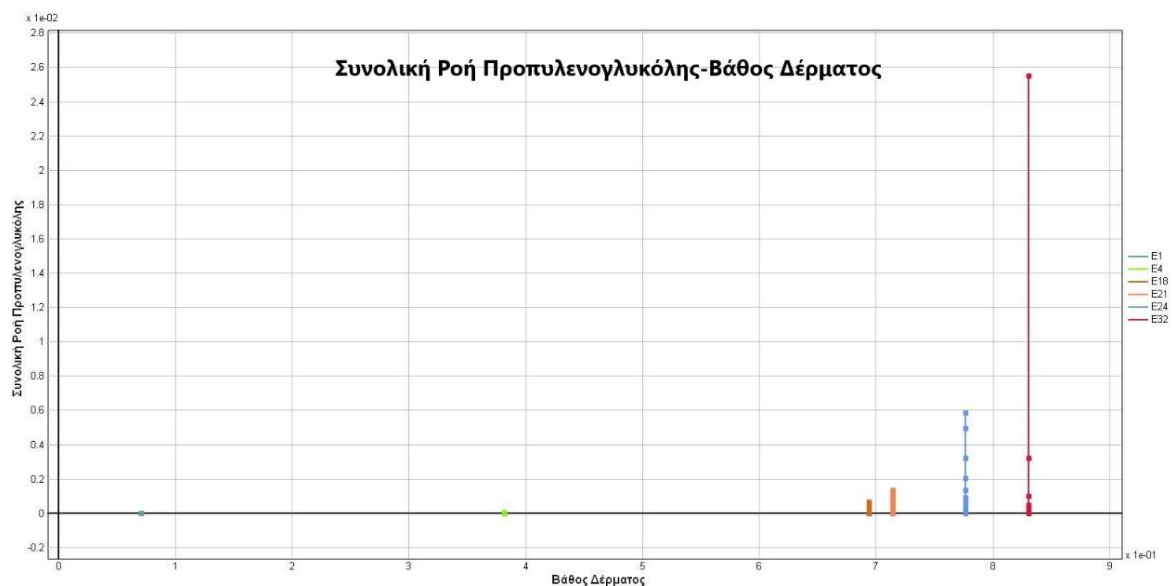
5.1.4. Μελέτη Μεταβολής της Συνολικής Ροής σε Συνάρτηση με τη Θέση στον Άξονα Z

❖ Κεράτινη Στιβάδα - Βιώσιμη Επιδερμίδα

Στο επόμενο στάδιο, μελετήσαμε τη συμπεριφορά της συνολικής ροής σε σχέση με τη θέση στον άξονα Z. Για το σκοπό αυτό, επελέγησαν πάλι 6 σημεία, τα τρία πρώτα στην κεράτινη στιβάδα (E21: Κάτω σημείο, E24: Ενδιάμεσο σημείο, E32: Πάνω Σημείο) και τρία επόμενα στην βιώσιμη επιδερμίδα (E1: Κάτω σημείο, E4: Ενδιάμεσο σημείο, E18: Πάνω σημείο), τόσο για το ελαϊκό οξύ (OA) όσο και για την προπυλενογλυκόλη (PG).



Διάγραμμα 21 : Συνολική Ροή Ελαϊκού Οξέος - Θέση στον Άξονα Z



Διάγραμμα 22 : Συνολική Ροή Προπυλενογλυκόλης - Θέση στον Άξονα Z

Για το OA, διαπιστώνουμε, ότι το ενδιάμεσο (E24) και το κάτω σημείο (E21) της κεράτινης στιβάδας, έχουν συνολική ροή σχεδόν μηδενική, σε σχέση με τη μεγάλη τιμή ροής στο ανώτερο σημείο (E32), στο οποίο διαχέεται πρώτα η ένωση. Στη βιώσιμη επιδερμίδα, όλα τα σημεία της (E1, E4, E18), έχουν αμελητέες τιμές συνολικής ροής, όπως κι αυτές των χαμηλότερων σημείων της κεράτινης στιβάδας (E24, E21).

Αντίθετα, για την PG τα σημεία που βρίσκονται στην κεράτινη στιβάδα, θα έχουν όλα σχετικά μεγαλύτερες τιμές ροής, σε σχέση με το OA. Για τη βιώσιμη επιδερμίδα, στο άνω σημείο της, η τιμή ροής θα είναι μεγαλύτερη απ' ότι στο OA, ενώ οι δύο άλλες τιμές είναι περίπου ίδιες με εκείνες του OA. Οι μεγαλύτερες κατά κανόνα τιμές της συνολικής ροής, για την PG, σε σχέση με το OA, οφείλεται στο συντελεστή διάχυσης, ο οποίος για την PG είναι κατά πολύ μεγαλύτερος (~30 φορές) από αυτόν του OA, και έχει ως αποτέλεσμα, η PG να φτάνει χαμηλότερα στο δέρμα.

❖ **Ροή ανά Ζεύγη : Κεράτινη Στιβάδα - Βιώσιμη Επιδερμίδα**

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την ποσοστιαία μεταβολή της ροής μεταξύ των ζευγών σημείων: Άνω σημείο κεράτινης στιβάδας - Άνω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας, Ενδιάμεσο σημείο κεράτινης στιβάδας - Ενδιάμεσο σημείο βιώσιμης επιδερμίδας, Κάτω σημείο κεράτινης στιβάδας - Κάτω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας. Έτσι οδηγηθήκαμε στα εξής αποτελέσματα:

- **Ελαϊκό οξύ**
 - Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της ροής είναι -98.98%.
 - Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -99.7%.
 - Κάτω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Κάτω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -99.9%.
- **Προπυλενογλυκόλη**
 - Άνω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Άνω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -97.4%.
 - Ενδιάμεσο Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Ενδιάμεσο Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -99.6%.
 - Κάτω Σημείο Κεράτινης Στιβάδας-Κάτω Σημείο Βιώσιμης Επιδερμίδας: Η ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης είναι -99.7%.

Οι παραπάνω μεταβολές δείχνουν ότι, τόσο για το OA, όσο και για την PG, η ποσοστιαία μεταβολή, μεταξύ των αντίστοιχων σημείων κάθε ζεύγους, της συνολικής ροής βαίνει μειούμενη.

❖ **Σχέση Ροής OA/PG κατά τον Κατακόρυφο Άξονα Z**

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την ποσοστιαία σχέση (OA/PG) της συνολικής ροής του ελαϊκού οξέος προς την προπυλενογλυκόλη για τα συγκεκριμένα σημεία (βάθη δέρματος) για την διάχυση της χημικής ένωσης κατά τον κατακόρυφο άξονα Z. Τα υπό μελέτη σημεία για την κεράτινη στιβάδα είναι τα εξής: E21: Κάτω σημείο, E24: Ενδιάμεσο σημείο, E32: Πάνω Σημείο και για τη βιώσιμη επιδερμίδα τα εξής: E1: Κάτω σημείο, E4: Ενδιάμεσο σημείο, E18: Πάνω σημείο. Μετά τη μελέτη των γραφικών παραστάσεων οδηγηθήκαμε στα εξής συμπεράσματα:

- Για το E32 (Επιφάνεια κεράτινης στιβάδας-0 μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συνολικής ροής του OA σε σχέση με την PG είναι 60%. Αυτό σημαίνει ότι η ροή του OA είναι σαφώς μικρότερη από τη ροή της PG, γεγονός που οφείλεται στο χαμηλότερο συντελεστή διάχυσης του OA.
- Για το E24 (Ενδιάμεσο σημείο κεράτινης στιβάδας-7 μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συνολικής ροής του OA σε σχέση με την PG είναι 5.86%.
- Για το E21 (Κάτω σημείο κεράτινης στιβάδας-14 μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συνολικής ροής του OA σε σχέση με την PG είναι 4.6%.
- Για το E18 (Επιφάνεια βιώσιμης επιδερμίδας-14 μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συνολικής ροής του OA σε σχέση με την PG είναι 4%, παρόμοιο με το παραπάνω, καθώς πρόκειται για το ίδιο σημείο.
- Για το E4 (Ενδιάμεσο σημείο βιώσιμης επιδερμίδας-39 μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συνολικής ροής του OA σε σχέση με την PG είναι 2.9%.
- Για το E1 (Κάτω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας-64 μm βάθος δέρματος): Το ποσοστό της συνολικής ροής του OA σε σχέση με την PG είναι 1.6%.

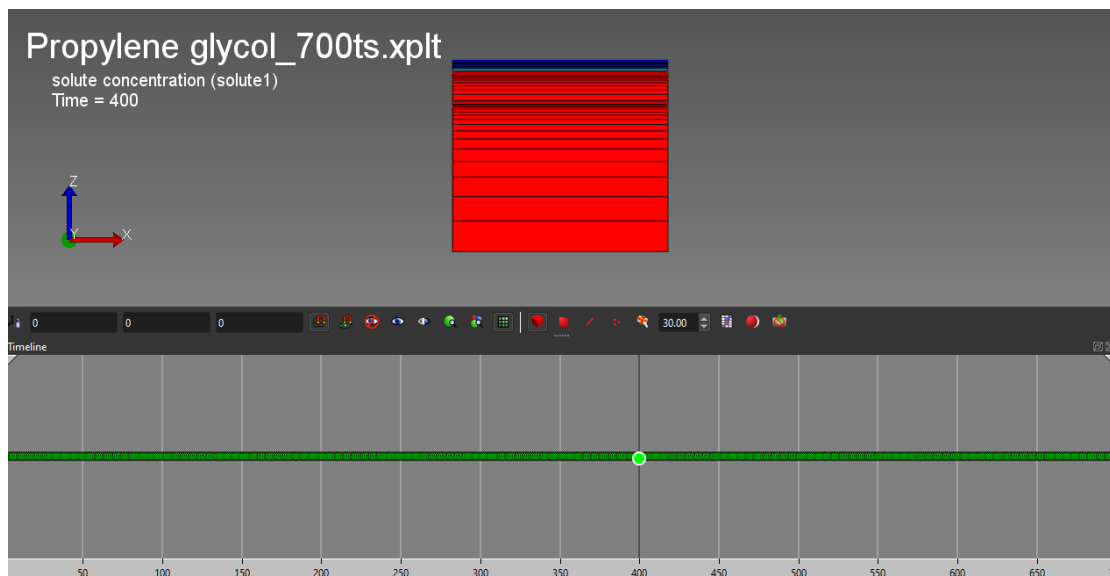
Επομένως, παρατηρούμε ότι όσο βαθύτερα διεισδύουμε στη βιώσιμη επιδερμίδα, τόσο λιγότερη ποσότητα OA θα διαχέεται, σε σχέση με την ποσότητα της PG. Αυτό, έρχεται σε πλήρη συμφωνία με όσα έχουν

διαπιστωθεί παραπάνω, σχετικά με την αμελητέα διάχυση του ΟΑ στην βιώσιμη επιδερμίδα, ενώ η ΡG διαχέεται μέχρι το κατώτερο στρώμα της βιώσιμης επιδερμίδας.

5.1.5. Στιγμιότυπα της Συγκέντρωσης με το Χρόνο

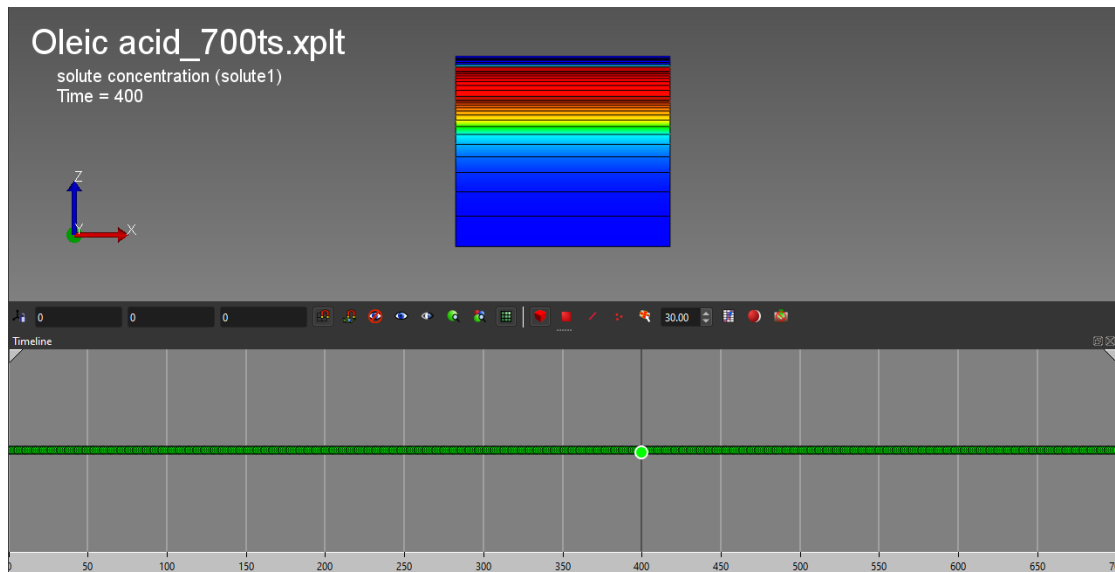
Στην ενότητα αυτή μελετώνται τα στιγμιότυπα της συγκέντρωσης με το χρόνο. Η μελέτη των στιγμιότυπων αυτών, έρχεται να επιβεβαιώσει και οπτικά την κατανομή της συγκέντρωσης του ΟΑ και της ΡG, τόσο στην κεράτινη στιβάδα, όσο και στη βιώσιμη επιδερμίδα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης περιγράφονται στη συνέχεια:

Η συγκέντρωση της ΡG, σταθεροποιείται για $t = 400$ timesteps (πραγματικός χρόνος $t = 8.57$ min (Εικόνα 24)):



Εικόνα 24: Αναπαράσταση Σταθεροποίησης της Συγκέντρωσης της Προπυλενογλυκόλης [t=400 timesteps]

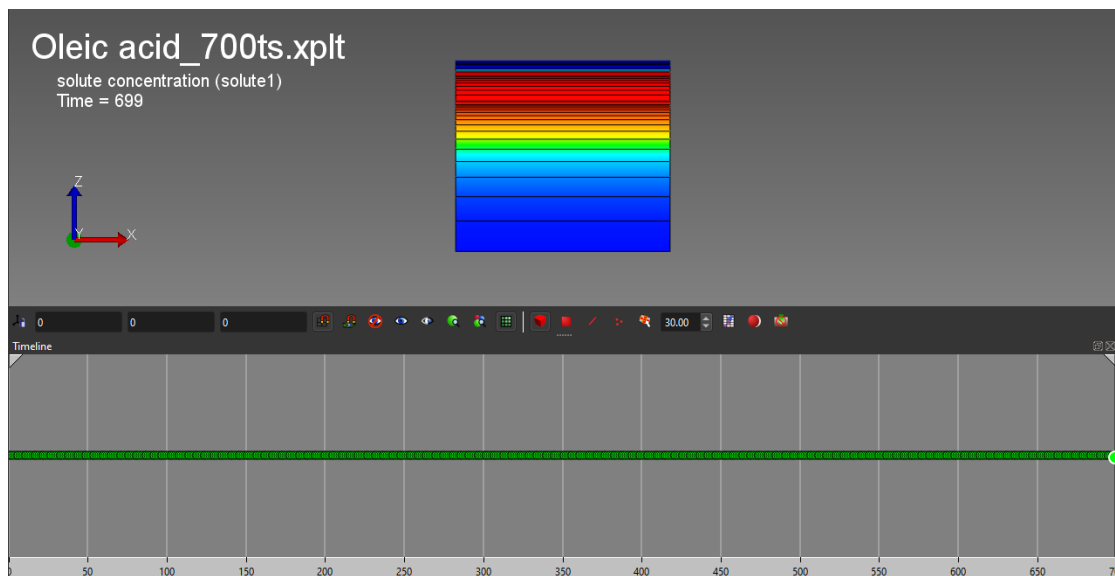
Για το ΟΑ για την συγκεκριμένη χρονική στιγμή ($t = 8.57$ min), θα ισχύει ότι φαίνεται στην Εικόνα 25:



Εικόνα 25: Αναπαράσταση της Συγκέντρωσης του Ελαϊκού οξέος [t =400 timesteps]

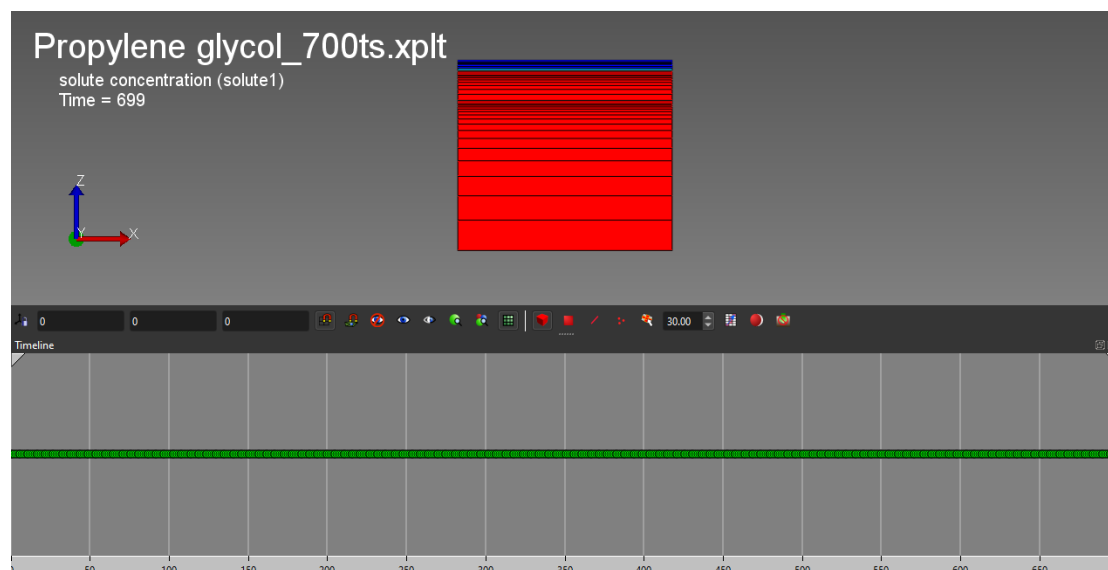
Από τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι, η συγκέντρωση της προπυλενογλυκόλης σταθεροποιείται για $t = 8.57 \text{ min}$, ενώ η συγκέντρωση του ελαϊκού οξέος για εκείνη την χρονική στιγμή δεν έχει σταθεροποιηθεί ακόμη.

Στο τέλος του πραγματικού χρόνου του φαινομένου (15 min), δηλαδή για $t = 700$ timesteps, παρατηρούμε ότι το OA έχει συγκεντρωθεί, κατά κύριο λόγο, στην κεράτινη στιβάδα και ένα αμελητέο ποσοστό φτάνει στο ανώτερο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας (Εικόνα 26):



Εικόνα 26: Αναπαράσταση της Συγκέντρωσης του Ελαϊκού Οξέος
[t=700 timesteps]

Το αντίστοιχο στιγμιότυπο συγκέντρωσης της PG, για την συγκεκριμένη χρονική στιγμή $t = 15 \text{ min}$, είναι αυτό που φαίνεται στην Εικόνα 27:



Εικόνα 27: Αναπαράσταση της Συγκέντρωσης της Προπυλενογλυκόλης
[$t = 700$ timesteps]

Από τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι για την PG, το στιγμιότυπο για $t=700$ timesteps, είναι πανομοιότυπο με εκείνο για $t=400$ timesteps, καθώς η συγκέντρωση της PG είχε ήδη σταθεροποιηθεί στο χρόνο αυτό, οπότε από εκεί και πέρα δεν παρατηρείται καμία διαφορά.

Για το OA, δεν παρατηρείται, μεταξύ των δύο στιγμιότυπων, καμία διαφορά στην κεράτινη στιβάδα, ενώ παρατηρείται μια αμελητέα διαφορά, στη βιώσιμη επιδερμίδα, πράγμα που σημαίνει ότι η επίπτωσή του σε αυτή είναι μηδαμινή.

Από όλες τις παραπάνω αναλύσεις, προκύπτει ότι το ελαϊκό οξύ περιορίζεται στην κεράτινη στιβάδα, ενώ η προπυλενογλυκόλη διαχέεται μέχρι τα χαμηλότερα στρώματα της βιώσιμης επιδερμίδας.

Συζήτηση

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η συγκέντρωση μεταβάλλεται εκθετικά και στη συνέχεια τείνει να σταθεροποιηθεί. Επίσης, για το ανώτερο σημείο της κεράτινης στιβάδας, έχουμε ταχύτερη μεταβολή της συγκέντρωσης, ενώ για το ανώτερο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, η μεταβολή είναι βραδύτερη. Όσον αφορά την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης, μεταξύ των δύο σημείων, και τη σταθεροποίησή της, για το ελαϊκό οξύ, παρατηρούμε ότι πραγματοποιείται για πραγματικό χρόνο $t = 6.43 \text{ min}$. Για την προπυλενογλυκόλη αντίστοιχα, η συγκέντρωση σταθεροποιείται για πραγματικό χρόνο $t = 4.29 \text{ min}$.

Στα ενδιάμεσα σημεία των παραπάνω στιβάδων, έχουμε την ίδια συμπεριφορά της συγκέντρωσης με το χρόνο, όσον αφορά την προπυλενογλυκόλη, ενώ για το ελαϊκό οξύ, στη βιώσιμη επιδερμίδα, η συγκέντρωση βαίνει συνεχώς αυξανόμενη, αλλά διατηρεί χαμηλότερη τιμή, όπως είναι αναμενόμενο, καθώς δεν φτάνει μεγάλη ποσότητα ελαϊκού οξέος μέχρι εκείνο το σημείο. Όσον αφορά, την εξισορρόπηση και σταθεροποίησή της συγκέντρωσης, μεταξύ των ενδιάμεσων σημείων, για το ελαϊκό οξύ αυτή δεν πραγματοποιείται, καθώς, δε φτάνει επαρκής ποσότητα ελαϊκού οξέος στο ενδιάμεσο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας. Για την προπυλενογλυκόλη από την άλλη, η συγκέντρωση σταθεροποιείται για πραγματικό χρόνο $t = 6.43 \text{ min}$. Από τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η προπυλενογλυκόλη διαχέεται με πιο γρήγορο ρυθμό από ότι το ελαϊκό οξύ.

Κατόπιν μελετήθηκε η συνολική ροή, με βάση το χρόνο, στα αντίστοιχα σημεία της κεράτινης στιβάδας και της βιώσιμης επιδερμίδας. Όπως μπορούμε να

παρατηρήσουμε, από τη μορφή των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων, το ελαϊκό οξύ φαίνεται να ρέει κατά κύριο λόγο εντός της κεράτινης στιβάδας και δεν διεισδύει καθόλου στα κατώτερα σημεία της βιώσιμης επιδερμίδας, ενώ η προπυλενογλυκόλη διαχέεται μέχρι το κάτω μέρος αυτής.

Στην βιώσιμη επιδερμίδα, η συνολική ροή αυξάνεται, σχετικά, με πιο αργό ρυθμό από ότι στην κεράτινη στιβάδα και με πιο χαμηλή μέγιστη τιμή, που είναι 1000 φορές μικρότερη για το ελαϊκό οξύ και 100 φορές μικρότερη για την προπυλενογλυκόλη, από ότι στην κεράτινη στιβάδα. Από αυτό συνάγεται ότι, στη βιώσιμη επιδερμίδα, η τιμή της ροής της προπυλενογλυκόλης, είναι 10πλάσια από εκείνη του ελαϊκού οξέος.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι, η συνολική ροή του ελαϊκού οξέος και της προπυλενογλυκόλης, μηδενίζεται τη χρονική στιγμή, κατά την οποία σταθεροποιείται και εξισορροπείται η συγκέντρωση μεταξύ των σημείων της κεράτινης στιβάδας και εκείνων της βιώσιμης επιδερμίδας. Εξαίρεση σε αυτή την παρατήρηση, και μόνο για το ελαϊκό οξύ, αποτελούν τα ενδιάμεσα σημεία της κεράτινης στιβάδας και της βιώσιμης επιδερμίδας, για τα οποία δεν έχει επέλθει εξισορρόπηση συγκεντρώσεων και επομένως, δεν υπάρχει μηδενισμός της ροής, καθώς το ελαϊκό οξύ δεν έχει φτάσει, στο σημείο εκείνο, στην τιμή σταθεροποίησης της συγκέντρωσης.

Ένα άλλο σημείο που είναι σημαντικό για τη μελέτη μας, είναι η σχέση της συγκέντρωσης, με βάση τη θέση στον άξονα Z (βάθος δέρματος). Παρατηρούμε, ότι η συγκέντρωση κατά τον άξονα Z είναι μεγαλύτερη, στα ανώτερα σημεία της κεράτινης στιβάδας και στη συνέχεια μειώνεται, καθώς προχωρούμε προς τα κάτω. Για το ελαϊκό οξύ, στο ενδιάμεσο και κατώτατο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας, η συγκέντρωση είναι πρακτικά μηδέν, πράγμα που σημαίνει ότι η διάχυση του ελαϊκού οξέος στη βιώσιμη επιδερμίδα είναι μηδαμινή. Για την προπυλενογλυκόλη, στην κεράτινη στιβάδα ακολουθείται το ίδιο μοτίβο μεταβολής, ενώ στη βιώσιμη επιδερμίδα, θα έχουμε σε όλα τα σημεία μη μηδενικές τιμές συγκέντρωσης.

Έπειτα, μελετήσαμε την ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης στην κεράτινη στιβάδα και στη βιώσιμη επιδερμίδα, τόσο για το ελαϊκό οξύ, όσο και για την

προπυλενογλυκόλη. Για το ελαϊκό οξύ, το ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης στην κεράτινη στιβάδα, θα ισούται με -82% , ενώ στη βιώσιμη επιδερμίδα, με -99% , πράγμα που σημαίνει ότι πρακτικά μηδενίζεται. Για την προπυλενογλυκόλη, το ποσοστό μεταβολής της συγκέντρωσης, τόσο στην κεράτινη στιβάδα, όσο και στη βιώσιμη επιδερμίδα θα ισούται με -75% . Από τα παραπάνω ποσοστά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, το ελαϊκό οξύ συγκεντρώνεται, κυρίως, στην κεράτινη στιβάδα, ενώ η προπυλενογλυκόλη διαχέεται τόσο στην κεράτινη στιβάδα, όσο και στην βιώσιμη επιδερμίδα.

Χρήσιμη, επίσης, αποδείχθηκε και η μελέτη της ποσοστιαίας μεταβολής της συγκέντρωσης, για τις δύο ουσίες, μεταξύ των ζευγών σημείων: Άνω σημείο κεράτινης στιβάδας - Άνω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας, Ενδιάμεσο σημείο κεράτινης στιβάδας - Ενδιάμεσο σημείο βιώσιμης επιδερμίδας, Κάτω σημείο κεράτινης στιβάδας - Κάτω σημείο βιώσιμης επιδερμίδας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, τόσο για το OA, όσο και για την PG, οι συγκεντρώσεις στη βιώσιμη επιδερμίδα είναι χαμηλότερες από αυτές στην κεράτινη στιβάδα. Από την άλλη, η μείωση στη βιώσιμη επιδερμίδα, είναι πολύ μεγαλύτερη για το ελαϊκό οξύ, από ότι για την προπυλενογλυκόλη.

Εξετάζοντας τώρα, την ποσοστιαία σχέση της συγκέντρωσης της προπυλενογλυκόλης προς το ελαϊκό οξύ (PG/OA), για το άνω, το μέσο και το κάτω σημείο, τόσο της κεράτινης όσο και της βιώσιμης επιδερμίδας παρατηρήσαμε ότι, όσο βαθύτερα διεισδύουμε στο δέρμα, το ποσοστό της συγκέντρωσης της προπυλενογλυκόλης σε σχέση με το ελαϊκό οξύ θα αυξάνεται, μέχρι να φτάσουμε στο κάτω μέρος της βιώσιμης επιδερμίδας όπου η προπυλενογλυκόλη θα εξακολουθεί να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση, από ότι το ελαϊκό οξύ (40 φορές), του οποίου η συγκέντρωση, πρακτικά, έχει μηδενιστεί.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σχέση της συνολικής ροής, με βάση τη θέση στον άξονα Z (βάθος δέρματος). Για το ελαϊκό οξύ, διαπιστώνουμε, ότι το ενδιάμεσο και το κάτω σημείο της κεράτινης στιβάδας, έχουν συνολική ροή σχεδόν μηδενική, σε σχέση με τη μεγάλη τιμή ροής στο ανώτερο σημείο αυτής. Στη βιώσιμη επιδερμίδα, όλα τα σημεία της, έχουν αμελητέες τιμές συνολικής ροής, όπως κι αυτές των χαμηλότερων σημείων της κεράτινης στιβάδας. Αντίθετα, για την

προπυλενογλυκόλη τα σημεία που βρίσκονται στην κεράτινη στιβάδα, θα έχουν όλα σχετικά μεγάλες τιμές ροής, σε σχέση με το ελαϊκό οξύ. Για τη βιώσιμη επιδερμίδα, η τιμή ροής θα είναι μεγαλύτερη από ότι στο ελαϊκό οξύ για όλα τα σημεία της. Οι μεγαλύτερες κατά κανόνα τιμές της συνολικής ροής, για την προπυλενογλυκόλη, σε σχέση με το ελαϊκό οξύ, οφείλονται στο συντελεστή διάχυσης, ο οποίος για την προπυλενογλυκόλη είναι κατά πολύ μεγαλύτερος (~ 30 φορές) από αυτόν του ελαϊκού οξέος.

Τέλος, μελετήσαμε τα στιγμιότυπα της συγκέντρωσης με το χρόνο. Η μελέτη των στιγμιότυπων αυτών, έρχεται να επιβεβαιώσει και οπτικά την κατανομή της συγκέντρωσης του ελαϊκού οξέος και της προπυλενογλυκόλης, τόσο στην κεράτινη στιβάδα, όσο και στη βιώσιμη επιδερμίδα. Από τη μελέτη των στιγμιότυπων, προκύπτει ότι η συγκέντρωση της προπυλενογλυκόλης, σταθεροποιείται για χρόνο $t = 8.57 \text{ min}$, ενώ για το ελαϊκό οξύ, στο χρόνο αυτό, δεν έχει σταθεροποιηθεί ακόμη.

Στο τέλος του φαινομένου (15 min), παρατηρούμε ότι το ελαϊκό οξύ έχει συγκεντρωθεί, κατά κύριο λόγο, στην κεράτινη στιβάδα και μια αμελητέα ποσότητα φτάνει στο ανώτερο σημείο της βιώσιμης επιδερμίδας. Το στιγμιότυπο της προπυλενογλυκόλης, στον παραπάνω χρόνο ($t=15 \text{ min}$), είναι πανομοιότυπο με εκείνο για $t=8.57 \text{ min}$, καθώς η συγκέντρωσή της είχε ήδη σταθεροποιηθεί στο χρόνο αυτό, οπότε από εκεί και πέρα δεν παρατηρείται καμία διαφορά. Για το ελαϊκό οξύ, δεν παρατηρείται, μεταξύ των δύο στιγμιότυπων, καμία διαφορά στην κεράτινη στιβάδα, ενώ παρατηρείται μια αμελητέα διαφορά, στη βιώσιμη επιδερμίδα, πράγμα που σημαίνει ότι η επίπτωσή του σε αυτή είναι μηδαμινή.

Από όλες τις παραπάνω αναλύσεις, προκύπτει ότι το ελαϊκό οξύ περιορίζεται στην κεράτινη στιβάδα, ενώ η προπυλενογλυκόλη διαχέεται μέχρι τα χαμηλότερα στρώματα της βιώσιμης επιδερμίδας. Όσο βαθύτερα διεισδύουμε, τόσο λιγότερη ποσότητα ελαϊκού οξέος θα διαχέεται, σε σχέση με την ποσότητα της προπυλενογλυκόλης. Αυτό, έρχεται σε πλήρη συμφωνία με όσα έχουν διαπιστωθεί παραπάνω, σχετικά με την αμελητέα διάχυση του ελαϊκού οξέος στην βιώσιμη επιδερμίδα και την μεγαλύτερη διάχυση της προπυλενογλυκόλης σε αυτήν.

Συνοψίζοντας, από τη μελέτη των στιγμιότυπων της συνολικής ροής σε συνάρτηση με το βάθος δέρματος, παρατηρήσαμε ότι το ελαϊκό οξύ διαχέεται σε βάθος 16 μm και η προπυλενογλυκόλη σε βάθος 22.4 μm . Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, κατά την οποία το ελαϊκό οξύ δε διαχέεται πέρα από την κεράτινη στιβάδα, ενώ η προπυλενογλυκόλη διαχέεται έως τα 22 μm σε βάθος δέρματος. Τα ποσοστά σφάλματος μεταξύ βιβλιογραφικών και υπολογιζόμενων από τη μελέτη μας τιμών υπολογίστηκαν σε 14.2% για το ελαϊκό οξύ και 1.8% για την προπυλενογλυκόλη. Τα σφάλματα αυτά μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι η μελέτη μας είναι πρώτης προσέγγισης, καθώς επίσης και στο γεγονός ότι τα OCAs αυξάνουν το πάχος της επιδερμίδας. Τέλος, το δέρμα είναι ένα ετερογενές όργανο το οποίο περιέχει διάφορα κύτταρα, θύλακες, αγγεία κλπ. τα οποία επηρεάζουν τη διάχυση των ενώσεων, στοιχεία που δεν έχουν ενσωματωθεί στη μοντελοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης. Έτσι σε μια μελλοντική και πιο αναλυτική μελέτη θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψιν η φυσιολογική δομή του δέρματος, το χόριο, τα διάφορα κύτταρα και αγγεία καθώς και η μοντελοποίηση της ροής του αίματος, η οποία όμως, θα απαιτούσε να συμπεριληφθούν και οι σχετικές βιοχημικές διεργασίες στα τριχοειδή αγγεία, ένα εγχείρημα που ξεπερνάει το πεδίο εφαρμογής της παρούσας μελέτης.

Με βάση τα αποτελέσματα μας, το καταλληλότερο index matching gel είναι η προπυλενογλυκόλη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως OCA, για την απεικόνιση δέρματος με χρήση της τεχνικής OCT. Είναι το index matching gel που διαχέεται μέχρι τα χαμηλότερα στρώματα της βιώσιμης επιδερμίδας, επιτυγχάνοντας οπτική διαύγηση του ιστού και διευκολύνει έτσι, την οπτική διείσδυση κατά την διαγνωστική οπτική τεχνική OCT. Όσον αφορά, στην τοξικότητα, η προπυλενογλυκόλη δεν θεωρείται ερεθιστική ή τοξική, ούτε μετά από μεμονωμένες, ούτε μετά επαναλαμβανόμενες εφαρμογές. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς κανέναν περιορισμό στις οπτικές τεχνικές.

Συμπεράσματα

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του καταλληλότερου index matching gel, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως optical clearing agent, μεταξύ της προπυλενογλυκόλης και του ελαϊκού οξέος, για την απεικόνιση με OCT.

Ως κατάλληλο θεωρείται το OCA το οποίο:

- Συμβάλλει περισσότερο στη μείωση του συντελεστή διάθλασης του δέρματος (και των εσώτερων δομών).
- Δε χαρακτηρίζεται από τοξικότητα και άλλες παρενέργειες.
- Διεisdύει σε ικανοποιητικό βαθμό στην βιώσιμη επιδερμίδα.

Με βάση τα αποτελέσματα μας, το index matching gel προπυλενογλυκόλη είναι το πιο κατάλληλο, προς χρήση, όσον αφορά στην απεικόνιση του δέρματος, καθώς τα δεδομένα που παραλαμβάνονται είναι μόνο από δερματικές δομές και όχι από άλλους εξωγενείς παράγοντες, με τη χρήση της τεχνικής OCT.

Αυτό συμβαίνει διότι:

- Είναι αυτό που διαχέεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στη βιώσιμη επιδερμίδα και πιο συγκεκριμένα, φτάνει σε πάχος δέρματος 22.4 μm
- Δε χαρακτηρίζεται από τοξικότητα και παρενέργειες όταν εφαρμόζεται για τη διενέργεια μιας οπτικής τεχνικής
- Οδηγεί στην καλύτερη αντιστοίχιση του συντελεστή διάθλασης του αέρα με το συντελεστή διάθλασης του δέρματος και πιο συγκεκριμένα, της επιδερμίδας.

Βιβλιογραφία

1. Ασημοπούλου-Μαρίνου Β., “In vitro μελέτες διαπερατότητας διαδερμικών συστημάτων Νιτρογλυκερίνης και Νικοτίνης διαμέσου της ανθρώπινης κεράτινης στιβάδας και της μεμβράνης Strat - M”. (2017).
2. Robert Schulz, K. Y., “Modelling of Drug Diffusion on Concentration Profiles in Healthy and Damaged Human Skin. Biophysical Society”, σσ. 998 - 1008. (2019, September 3), doi: 10.1016/j.bpj.2019.07.027.
3. Limbert, G. “Mathematical and computational modelling of skin biophysics: a review. Royal Society”, (2017, Ιούνιος 21), doi: 10.1098/rspa.2017.0257.
4. Vadim D. Genin, E. A “Measurement of diffusion coefficient of propylene glycol in skin tissue”, (2014, Ιανουάριος), doi:10.1117/12.2180052.
5. Vytis Čižinauskas, N. E. “Fatty acids penetration into human skin ex vivo: A TOF - SIMS analysis approach”. Bionter phases. (2017, Μάρτιος 2) doi: 10.1116/1.4977941.
6. Thijs Defraeye, F. B. “Predicting transdermal fentanyl delivery using mechanistic simulations for tailored therapy”. bioRxiv, (2020, Ιούνιος 17), doi: 10.1101/2020.06.16.154195.
7. Shruti Davey, N. P. (2011). “Diffusion Across Skin, Diffusion of Lidocaine”.
8. Dominik Selzer, D. N.-H.-M. “A strategy for in-silico prediction of skin absorption in man. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics”, (2015, Μάιος 6), doi: 10.1016/j.ejpb.2015.05.002.
9. KOJI YAMAGUCHI, T. M., “Structure–Permeability Relationship Analysis of the Permeation Barrier Properties of the Stratum Corneum and Viable Epidermis/Dermis of Rat Skin”. Wiley InterScience, (2007, Ιούνιος 20) doi: 10.1002/jps.2133.
10. Murphrey, M. B., Miao, J. H., & Zito, P. M. (χ.χ.). Histology, Stratum Corneum.
11. University of Leeds. Ανάκτηση από (2022, Απρίλιος). https://www.histology.leeds.ac.uk/skin/epidermis_layers.php, [12]

12. ALESSANDRA PAGLIARA, M. R.-A., "Evaluation and Prediction of Drug Permeation", (1999, Ιούλιος 22).
13. Κοντογιαννίδου Ε., "Διαδερμική χορήγηση μακρομορίων με τη χρήση φυσικών και χημικών αυξητικών παραγόντων", (2015).
14. Ελληνική Δερματοχειρουργική, "Τοπική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκου με νέα φαρμακοτεχνικά συστήματα/Topical and transdermal drug delivery with pharmacotechnical formulations", (2007).
15. Aziz Karim, "Transdermal Absorption: A Unique Opportunity for Constant Delivery of Nitroglycerin, Drug Development and Industrial Pharmacy", 9:4, 671-689, (1983), doi: 10.3109/03639048309044698.
16. ΝΤΥΜΕΝΟΥ, Β. Π., "Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων: Ι] Σύγκριση διαφόρων τύπων ελαστικών λιποσωμάτων και μελέτη μηχανισμού αύξησης διαπερατότητας υδατοδιαλυτών φαρμάκων με τη χρήση τους. ΙΙ] Αύξηση διαπερατότητας αντιυπερτασικών φαρμάκων με συστήματα ενισχυτών διαπέρασης", Πάτρα, (2012).
17. Xinpei Zhu, L. H., "Ultrafast optical clearing method for three-dimensional imaging with cellular resolution. PNAS", (2019, Μάϊος 17), doi: 10.1073/pnas.1819583116.
18. J. JIANG, R. K., "The Clinical Availability of Oleic Acid as an Enhancer in Optical Clearing of Skin Tissue in vitro", (2005), doi:10.1117/12.592895.
19. J. JIANG, L. Zhang, S. P., "OCT image contrast improvement of skin tissue by using oleic acid as enhancer", (2005), doi:10.1117/12.576996.
20. Dan Zhu, K. V., "Recent progress in tissue optical clearing". NIH, PMC. (2013, Φεβρουάριος 5), doi:10.1002/lpor.201200056,
21. Βαράκα Μαρία, "Ανάλυση οπτικών ιδιοτήτων δέρματος με Οπτική Τομογραφία Συνοχής", (2021).
22. ZHONGWEI ZHI, Z. H., "IMPROVE OPTICAL CLEARING OF SKIN IN VITRO WITH PROPYLENE GLYCOL AS A PENETRATION ENHANCER". Journal of Innovative Optical Health Sciences, σσ. 269-278, (2009), doi: 10.1142/S1793545809000590.
23. Ruikang K Wang, J. B., "Propylene glycol as a contrasting agent for optical coherence tomography to image gastrointestinal tissues". NIH, PubMed.gov. (2002), doi:10.1002/lsm.10013.

24. European Medicines Agency, “Propylene glycol used as an excipient”, (2017, Οκτώβριος 9).
25. Τσέλα Ν., “Μελέτη και κατασκευή ευέλικτης ηλεκτρικής διέγερσης για διαδερμική χορήγηση φαρμάκων με ιοντοφόρηση”, (2019).
26. Pawlaczyk Mariola, Lelonkiewicz Monika, & Wieczorowski Michał. “Age-dependent biomechanical properties of the skin. *Advances in Dermatology and Allergology*”, 302–306, (2013), doi: 10.5114/pdia.2013.38359.
27. Tuchin Valery V., Zhu Dan, & Genina Elina A. (Eds.), *Handbook of Tissue Optical Clearing New Prospects in Optical Imaging* (1st ed.), CRC Press Taylor and Francis Group, (2022).
28. W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, “A Review of the Optical Properties of Biological Tissues,” *IEEE J. Quantum Electron.* 26(12), 2166–2185 (1990).
29. V. V. Tuchin, *Optical clearing of tissues and blood*. Vol. PM154 (2006). [42]
30. V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. H. Mavlyutov, and A. A. Mishin, “Light propagation in tissues with controlled optical properties,” *J. Biomed. Opt.* 2(4), 401–417 (1997).
31. G. Vargas, E. K. Chan, J. K. Barton, H. G. Rylander 3rd, and A. J. Welch, “Use of an agent to reduce scattering in skin,” *Lasers Surg. Med.* 24(2), 133–141 (1999).
32. H. Liu, B. Beauvoit, M. Kimura, and B. Chance, “Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity,” *J. Biomed. Opt.* 1(2), 200–211 (1996).
33. J. A. Kiernan, *Histological and Histochemical Methods*, 3rd edition edn, (Oxford Univeristy Press, 1999).
34. D. S. Richardson and J. W. Lichtman, “Clarifying Tissue Clearing,” *Cell* 162(2), 246–257 (2015).
35. Y. He and R. K. K. Wang, “Dynamic optical clearing effect of tissue impregnated with hyperosmotic agents and studied with optical coherence tomography,” *J. Biomed. Opt.* 9(1), 200–206 (2004).
36. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, “Reversible dissociation of collagen in tissues,” *J. Invest. Dermatol.* 121(6), 1332–1335 (2003).
37. F. Zuluaga, R. Drezek, T. Collier, R. Lotan, M. Follen, and R. Richards-Kortum, “Contrast agents for confocal microscopy: how simple chemicals affect

- confocal images of normal and cancer cells in suspension," *J. Biomed. Opt.* 7(3), 398–403 (2002).
38. V. Meglinski, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, D. Y. Churmakov, and V. V. Tuchin, "The enhancement of confocal images of tissues at bulk optical immersion," *Laser Phys.* 13, 65–69 (2003).
 39. A. L. Allegra Mascaro, I. Costantini, E. Margoni, G. Iannello, A. Bria, L. Sacconi, and F. S. Pavone, "Label-free near-infrared reflectance microscopy as a complimentary tool for two-photon fluorescence brain imaging," *Biomed. Opt. Express* 6(11), 4483–4492 (2015).
 40. R. Cicchi, D. Sampson, D. Massi, and F. Pavone, "Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin ex vivo by use of optical clearing agents," *Opt. Express* 13(7), 2337–2344 (2005).
 41. E. Olson, M. J. Levene, and R. Torres, "Multiphoton microscopy with clearing for three-dimensional histology of kidney biopsies," *Biomed. Opt. Express* 7(8), 3089–3096 (2016).
 42. J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. Stelzer, "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy," *Science* 305(5686), 1007–1009 (2004).
 43. H. U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jährling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgänsberger, and K. Becker, "Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain," *Nat. Methods* 4(4), 331–336 (2007).
 44. P. J. Keller and H. U. Dodt, "Light sheet microscopy of living or cleared specimens," *Curr. Opin. Neurobiol.* 22(1), 138–143 (2012).
 45. A. K. Dunn, V. P. Wallace, M. Coleno, M. W. Berns, and B. J. Tromberg, "Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples," *Appl. Opt.* 39(7), 1194–1201 (2000).
 46. M. Gu, X. S. Gan, A. Kisteman, and M. G. Xu, "Comparison of penetration depth between two-photon excitation and single-photon excitation in imaging through turbid tissue media," *Appl. Phys. Lett.* 77(10), 1551–1553 (2000).
 47. L. Silvestri, A. Bria, I. Costantini, L. Sacconi, H. C. Peng, G. Iannello, and F. S. Pavone, "Micron-scale Resolution Optical Tomography of Entire Mouse Brains with Confocal Light Sheet Microscopy" *Jove-J Vis Exp*, (2013).

48. M. C. Müllenbroich, L. Silvestri, L. Onofri, I. Costantini, M. V. Hoff, L. Sacconi, G. Iannello, and F. S. Pavone, "Comprehensive optical and data management infrastructure for high-throughput light-sheet microscopy of whole mouse brains," *Neurophotonics* 2(4), 041404 (2015).
49. W. Spalteholz, *Über das durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen präparaten und seine theoretischen bedingungen*. 2. AUFL. Edn, (1914).
50. H. Steinke and W. Wolff, "A modified Spalteholz technique with preservation of the histology," *Ann. Anat.* 183(1), 91–95 (2001).
51. V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, I. L. Kon, A. K. Mavlutov, and A. A. Mishin, "Light propagation in tissues with controlled optical properties," *P Soc Photo-Opt Ins* 2925, 118–142 (1996).
52. J. Wang, X. Zhou, S. Duan, Z. W. Chen, and D. Zhu, "Improvement of in vivo rat skin optical clearing with chemical penetration enhancers," *Proc. SPIE* 7883, 78830Y (2011).
53. B. Chance, H. Liu, T. Kitai, and Y. Zhang, "Effects of solutes on optical properties of biological materials: models, cells, and tissues," *Anal. Biochem.* 227(2), 351–362 (1995).
54. B. Choi, L. Tsu, E. Chen, T. S. Ishak, S. M. Iskandar, S. Chess, and J. S. Nelson, "Determination of chemical agent optical clearing potential using in vitro human skin," *Lasers Surg. Med.* 36(2), 72–75 (2005).
55. S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues: a review," *Phys. Med. Biol.* 58(11), R37–R61 (2013).
56. L. Silvestri, I. Costantini, L. Sacconi, and F. S. Pavone, "Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective," *J. Biomed. Opt.* 21(8), 081205 (2016).
57. K. Chung, J. Wallace, S. Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A. S. Andalman, T. J. Davidson, J. J. Mirzabekov, K. A. Zalocusky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grosenick, V. Gradinaru, and K. Deisseroth, "Structural and molecular interrogation of intact biological systems," *Nature* 497(7449), 332–337 (2013).
58. A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, E. A. Genina, A. N. Bashkatov, J. Lademann, and V. V. Tuchin, "Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application," *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 197, 216– 229 (2018).

59. T. Yu, Y. Qi, H. Gong, Q. Luo, and D. Zhu, "Optical clearing for multiscale biological tissues," *J. Biophotonics* 11(2), e201700187 (2018).
60. A. Ertürk, K. Becker, N. Jährling, C. P. Mauch, C. D. Hojer, J. G. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng, and H. U. Dodt, "Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO," *Nat. Protoc.* 7(11), 1983–1995 (2012).
61. K. Becker, N. Jährling, S. Saghafi, R. Weiler, and H. U. Dodt, "Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains," *PLoS One* 7(3), e33916 (2012).
62. N. Renier, Z. Wu, D. J. Simon, J. Yang, P. Ariel, and M. Tessier-Lavigne, "iDISCO: A Simple, Rapid method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging," *Cell* 159(4), 896–910 (2014).
63. M. K. Schwarz, A. Scherbarth, R. Sprengel, J. Engelhardt, P. Theer, and G. Giese, "Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains," *PLoS One* 10(5), e0124650 (2015).
64. R. Torres, H. Velazquez, J. J. Chang, M. J. Levene, G. Moeckel, G. V. Desir, and R. Safirstein, "Three- Dimensional Morphology by Multiphoton Microscopy with Clearing in a Model of Cisplatin-Induced CKD," *J. Am. Soc. Nephrol.* 27(4), 1102–1112 (2016).
65. R. Torres, S. Vesuna, and M. J. Levene, "High-resolution, 2- and 3-dimensional imaging of uncut, unembedded tissue biopsy samples," *Arch. Pathol. Lab. Med.* 138(3), 395–402 (2014).
66. C. Pan, R. Cai, F. P. Quacquarelli, A. Ghasemigharagoz, A. Loubopoulos, P. Matryba, N. Plesnila, M. Dichgans, F. Hellal, and A. Ertürk, "Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO," *Nat. Methods* 13(10), 859–867 (2016).
67. X. J. Wang, T. E. Milner, M. C. Chang, and J. S. Nelson, "Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry," *J. Biomed. Opt.* 1(2), 212–216 (1996).
68. V. V. Tuchin, A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Y. P. Sinichkin, and N. A. Lakodina, "In vivo investigation of the immersion-liquid-induced human skin clearing dynamics," *Tech. Phys. Lett.* 27(6), 489–490 (2001).
69. V. V. Tuchin, G. B. Altshuler, A. A. Gavrilova, A. B. Pravdin, D. Tabatadze, J. Childs, and I. V. Yaroslavsky, "Optical clearing of skin using flash lamp-induced enhancement of epidermal permeability," *Lasers Surg. Med.* 38(9), 824–836 (2006).

70. V. V. Tuchin, "Optical clearing of tissues and blood using the immersion method," *J. Phys. D Appl. Phys.* 38(15), 2497–2518 (2005).
71. Y. Qi, T. Yu, J. Xu, P. Wan, Y. Ma, J. Zhu, Y. Li, H. Gong, Q. Luo, and D. Zhu, "FDISCO: Advanced solventbased clearing method for imaging whole organs," *Sci. Adv.* 5(1), u8355 (2019).
72. M. T. Ke, S. Fujimoto, and T. Imai, "SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction," *Nat. Neurosci.* 16(8), 1154–1161 (2013).
73. P. S. Tsai, J. P. Kaufhold, P. Blinder, B. Friedman, P. J. Drew, H. J. Karten, P. D. Lyden, and D. Kleinfeld, "Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels," *J. Neurosci.* 29(46), 14553–14570 (2009).
74. I. Costantini, J. P. Ghobril, A. P. Di Giovanna, A. L. Allegra Mascaro, L. Silvestri, M. C. Müllenbroich, L. Onofri, V. Conti, F. Vanzi, L. Sacconi, R. Guerrini, H. Markram, G. Iannello, and F. S. Pavone, "A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging," *Sci. Rep.* 5(1), 9808 (2015).
75. T. Staudt, M. C. Lang, R. Medda, J. Engelhardt, and S. W. Hell, "2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy," *Microsc. Res. Tech.* 70(1), 1–9 (2007).
76. Y. Aoyagi, R. Kawakami, H. Osanai, T. Hibi, and T. Nemoto, "A Rapid Optical Clearing Protocol Using 2,2'-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain," *PLoS One* 10(1), e0116280 (2015).
77. H. Hama, H. Kurokawa, H. Kawano, R. Ando, T. Shimogori, H. Noda, K. Fukami, A. Sakaue-Sawano, and A. Miyawaki, "Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain," *Nat. Neurosci.* 14(11), 1481–1488 (2011).
78. T. Kuwajima, A. A. Sitko, P. Bhansali, C. Jurgens, W. Guido, and C. Mason, "ClearT: a detergent- and solventfree clearing method for neuronal and non-neuronal tissue," *Development* 140(6), 1364–1368 (2013).
79. D. Jing, S. Zhang, W. Luo, X. Gao, Y. Men, C. Ma, X. Liu, Y. Yi, A. Bugde, B. O. Zhou, Z. Zhao, Q. Yuan, J. Q. Feng, L. Gao, W. P. Ge, and H. Zhao, "Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method," *Cell Res.* 28(8), 803–818 (2018).

80. T. Yu, J. Zhu, Y. Li, Y. Ma, J. Wang, X. Cheng, S. Jin, Q. Sun, X. Li, H. Gong, Q. Luo, F. Xu, S. Zhao, and D. Zhu, "RTF: a rapid and versatile tissue optical clearing method," *Sci. Rep.* 8(1), 1964 (2018).
81. X. Wen, Z. Mao, Z. Han, V. V. Tuchin, and D. Zhu, "In vivo skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism," *J. Biophotonics* 3(1-2), 44–52 (2010).
82. E. A. Susaki, K. Tainaka, D. Perrin, F. Kishino, T. Tawara, T. M. Watanabe, C. Yokoyama, H. Onoe, M. Eguchi, S. Yamaguchi, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Shimizu, A. Miyawaki, H. Yokota, and H. R. Ueda, "Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis," *Cell* 157(3), 726–739 (2014).
83. B. Hou, D. Zhang, S. Zhao, M. Wei, Z. Yang, S. Wang, J. Wang, X. Zhang, B. Liu, L. Fan, Y. Li, Z. Qiu, C. Zhang, and T. Jiang, "Scalable and Dil-compatible optical clearance of the mammalian brain," *Front. Neuroanat.* 9, 19 (2015).
84. H. Hama, H. Hioki, K. Namiki, T. Hoshida, H. Kurokawa, F. Ishidate, T. Kaneko, T. Akagi, T. Saito, T. Saido, and A. Miyawaki, "ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging," *Nat. Neurosci.* 18(10), 1518–1529 (2015).
85. X. Q. Xu, Y. H. He, S. Proskurin, R. K. K. Wang, and J. Elder, "Optical clearing of in vivo human skin with hyperosmotic chemicals investigated by optical coherence tomography and near infrared reflectance spectroscopy," *Proc. SPIE* 5486, 129–135 (2003).
86. S. R. Millon, K. M. Roldan-Perez, K. M. Riching, G. M. Palmer, and N. Ramanujam, "Effect of optical clearing agents on the in vivo optical properties of squamous epithelial tissue," *Lasers Surg. Med.* 38(10), 920–927 (2006).
87. D. Zhu, J. Wang, Z. Zhi, X. Wen, and Q. Luo, "Imaging dermal blood flow through the intact rat skin with an optical clearing method," *J. Biomed. Opt.* 15(2), 026008 (2010).
88. D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, "Recent progress in tissue optical clearing," *Laser Photonics Rev.* 7(5), 732–757 (2013).
89. Z. Deng, L. Jing, N. Wu, P. Lv, X. Jiang, Q. Ren, and C. Li, "Viscous optical clearing agent for in vivo optical imaging," *J. Biomed. Opt.* 19(7), 76019 (2014).
90. L. Deng, W. Feng, T. Yu, and D. Zhu, "Facile synthesis of nitrogen-doped carbon dots with robust fluorescence in a strongly alkaline solution and a

- reversible fluorescence 'off-on' switch between strongly acidic and alkaline solutions," *RCS Advances* 110, 108203E (2016).
91. X. Y. Liu and B. Chen, "In Vivo Experimental Study on the Enhancement of Optical Clearing Effect by Laser Irradiation in Conjunction with a Chemical Penetration Enhancer," *Appl. Sci. (Basel)* 9(3), 542 (2019).
 92. R. Barer, "Refractometry and interferometry of living cells," *J. Opt. Soc. Am.* 47(6), 545–556 (1957).
 93. R. Vanbever and V. Pr at, "In vivo efficacy and safety of skin electroporation," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35(1), 77–88 (1999).
 94. C. Lombry, N. Dujardin, and V. Pr at, "Transdermal delivery of macromolecules using skin electroporation," *Pharm. Res.* 17(1), 32–37 (2000).
 95. A. V. Badkar and A. K. Banga, "Electrically enhanced transdermal delivery of a macromolecule," *J. Pharm. Pharmacol.* 54(7), 907–912 (2002).
 96. J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research," *Acta Physiol. Scand.* 177(4), 437–447 (2003).
 97. S. N. Murthy, A. Sen, and S. W. Hui, "Surfactant-enhanced transdermal delivery by electroporation," *J. Control. Release* 98(2), 307–315 (2004).
 98. M. R. Prausnitz, J. A. Gimm, R. H. Guy, R. Langer, J. C. Weaver, and C. Cullander, "Imaging regions of transport across human stratum corneum during high-voltage and low-voltage exposures," *J. Pharm. Sci.* 85(12), 1363–1370 (1996).
 99. Y. A. Chizmadzhev, A. V. Indenbom, P. I. Kuzmin, S. V. Galichenko, J. C. Weaver, and R. O. Potts, "Electrical properties of skin at moderate voltages: Contribution of appendageal macropores," *Biophys. J.* 74(2 Pt 1), 843–856 (1998).
 100. P. G. Johnson, S. W. Hui, and A. R. Oseroff, "Electrically enhanced percutaneous delivery of deltaaminolevulinic acid using electric pulses and a DC potential," *Photochem. Photobiol.* 75(5), 534–540 (2002).
 101. R. K. K. Wang, X. Q. Xu, V. V. Tuchin, and J. B. Elder, "Concurrent enhancement of imaging depth and contrast for optical coherence tomography by hyperosmotic agents," *J. Opt. Soc. Am. B* 18(7), 948–953 (2001).

102. A. T. Yeh and J. Hirshburg, "Molecular interactions of exogenous chemical agents with collagen—implications for tissue optical clearing," *J. Biomed. Opt.* 11(1), 014003 (2006).
103. J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, "Collagen solubility correlates with skin optical clearing," *J. Biomed. Opt.* 11(4), 040501 (2006).
104. J. Hirshburg, B. Choi, J. S. Nelson, and A. T. Yeh, "Correlation between collagen solubility and skin optical clearing using sugars," *Lasers Surg. Med.* 39(2), 140–144 (2007).
105. J. M. Hirshburg, K. M. Ravikumar, W. Hwang, and A. T. Yeh, "Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues," *J. Biomed. Opt.* 15(5), 055002 (2010).
106. R. Samatham, K. G. Phillips, and S. L. Jacques, "Assessment of Optical Clearing Agents Using Reflectance-Mode Confocal Scanning Laser Microscopy," *J. Innov. Opt. Health Sci.* 3(03), 183–188 (2010).
107. Z. Mao, Z. Han, X. Wen, Q. Luo, and D. Zhu, "Influence of glycerol with different concentrations on skin optical clearing and morphological changes in vivo," *Proc. SPIE* 7278, 72781I (2008).
108. O. Stumpp, B. Chen, and A. J. Welch, "Using sandpaper for noninvasive transepidermal optical skin clearing agent delivery," *J. Biomed. Opt.* 11(4), 041118 (2006).
109. R. Shi, L. Guo, C. Zhang, W. Feng, P. Li, Z. Ding, and D. Zhu, "A useful way to develop effective in vivo skin optical clearing agents," *J. Biophotonics* 10(6-7), 887–895 (2017).
110. X. Q. Xu and Q. H. Zhu, "Sonophoretic delivery for contrast and depth improvement in skin optical coherence tomography," *IEEE J Sel Top Quant* 14(1), 56–61 (2008).
111. J. Yoon, T. Son, E. H. Choi, B. Choi, J. S. Nelson, and B. Jung, "Enhancement of optical skin clearing efficacy using a microneedle roller," *J. Biomed. Opt.* 13(2), 021103 (2008).
112. S. A. Gallo, A. Sen, M. L. Hensen, and S. W. Hui, "Time-dependent ultrastructural changes to porcine stratum corneum following an electric pulse," *Biophys. J.* 76(5), 2824–2832 (1999).

113. A. Sen, Y. Zhao, L. Zhang, and S. W. Hui, "Enhanced transdermal transport by electroporation using anionic lipids," *J. Control. Release* 82(2-3), 399–405 (2002).
114. S. A. Gallo, A. Sen, M. L. Hensen, and S. W. Hui, "Temperature-dependent electrical and ultrastructural characterizations of porcine skin upon electroporation," *Biophys. J.* 82(1 Pt 1), 109–119 (2002).
115. U. Pliquett, S. Gallo, S. W. Hui, Ch. Gusbeth, and E. Neumann, "Local and transient structural changes in stratum corneum at high electric fields: contribution of Joule heating," *Bioelectrochemistry* 67(1), 37–46 (2005).
116. X. Q. Xu and Q. H. Zhu, "Evaluation of skin optical clearing enhancement with Azone as a penetration enhancer," *Opt. Commun.* 279(1), 223–228 (2007).
117. R. A. McClure, C. Stoianovici, S. Karma, and B. Choi, "Revisiting Optical Clearing with Dimethyl Sulfoxide (DMSO): In Vitro and In Vivo Studies," *Proc SPIE* 7187, 718707 (2009).
118. K. D. Peck, A. H. Ghanem, and W. I. Higuchi, "Hindered Diffusion of Polar Molecules through and Effective Pore Radii Estimates of Intact and Ethanol Treated Human Epidermal Membrane," *Pharm. Res.* 11(9), 1306–1314 (1994).
119. J. Wang, R. Shi, and D. Zhu, "Switchable skin window induced by optical clearing method for dermal blood flow imaging," *J. Biomed. Opt.* 18(6), 061209 (2012).
120. Omnia Hamdy, Rania M. Abdelazeem, "Toward Better Medical Diagnosis: Tissue Optical Clearing", *JOURNAL OF PUBLIC HEALTH INTERNATIONAL* (2020, Ιανουάριος 01), doi: 10.14302/issn.2641-4538.jphi-19-3132.
121. R. K. Wang and J. B. Elder, "Propylene Glycol As a Contrasting Agent for Optical Coherence Tomography to Image Gastrointestinal Tissues," *Lasers Surg. Med.*, vol. 30, pp. 201–208, (2002).
122. S. R. Millon, K. M. Roldan-perez, K. M. Riching, G. M. Palmer, and N. Ramanujam, "Effect of Optical Clearing Agents on the In Vivo Optical Properties of Squamous Epithelial Tissue," *Lasers Surg. Med.*, vol. 38, pp. 920–927, (2006).
123. A. N. Bashkatov et al., "Optical clearing of human eye sclera under the action of glucose solution," *Proc. SPIE*, vol. 6535, no. 653515, pp. 1–8, (2007).

124. X. Wen, Z. Mao, Z. Han, V. V Tuchin, and D. Zhu, "In vivo skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism," *J. Biophoton.*, vol. 3, no. 1–2, pp. 44–52, (2010).
125. N. Sudheendran, M. Mohamed, M. G. Ghosn, V. V. Tuchin, and K. V. Larin, "Assessment Of Tissue Optical Clearing As A Function Of Glucose Concentration Using Optical Coherence Tomography," *J Innov Opt Heal. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 169–176, (2011).
126. Z. Deng, C. Liu, W. Tao, and D. Zhu, "Improvement of skin optical clearing efficacy by topical treatment of glycerol at different temperatures Improvement of skin optical clearing efficacy by topical treatment of glycerol at different temperatures," *J. Phys. Conf. Ser*, vol. 277, no. 012007, pp. 1–8, (2011).
127. Y. Liu, X. Yang, D. Zhu, R. Shi, and Q. Luo, "Optical clearing agents improve photoacoustic imaging in the optical diffusive regime," *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 20, pp. 4236–4239, (2013).
128. S. Calve, A. Ready, C. Huppenbauer, and R. Main, "Optical Clearing in Dense Connective Tissues to Visualize Cellular Connectivity In Situ," *PLoS One*, pp. 1–14, (2015).
129. T. Lagerweij, S. A. Dusoswa, A. Negrean, J. P. M. Yvette, and V. K. Pieter, "Optical clearing and fluorescence deep-tissue imaging for 3D quantitative analysis of the brain tumor microenvironment," *Angiogenes.*, vol. 20, pp. 533–546, (2017).
130. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V Tuchin, "Optical clearing of human dura mater by glucose solutions," *J Biomed. Photonics Eng*, vol. 3, no. 1, pp. 010309-1–9, (2017).
131. V. S. M. Carneiro et al., "Optical Clearing Agents Associated with Nanoparticles for Scanning Dental Structures with Optical Coherence Tomography," in *CLEO*, pp. 3–4, (2017).
132. V. B. Yang, D. A. Curtis, D. Fried, and A. S. Preparation, "Use of Optical Clearing Agents for Imaging Root Surfaces With Optical Coherence Tomography," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–7, (2019).
133. C. Li, G. Guan, R. R., Z. Huang and R. K. Wang, "Determining elastic properties of skin by measuring surface waves from an impulse mechanical

stimulus using phase-sensitive optical coherence tomography”, The Royal Society Publishing, (2011).

134. I. Constantini, R. Cicchi, L. Silvestri, F. Vanzi, F. S. Pavone, “In-vivo and ex-vivo optical clearing methods for biological tissues: review”, *Biomedical Optics Express*, (2019). [158]
135. “FEBio Studio User’s Manual Version 1.6”, (2021). [163]
136. X. Wen, V. V. Tuchin, Q. Luo, D. Zhu, “Controlling the scattering of Intralipid by using optical clearing agents”, *Phys. Med. Biol.* 54 6917–6930, (2009), doi:10.1088/0031-9155/54/22/011. [164]

CAD	Computer Aided Design
CLARITY	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
ClearT	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
ClearT2	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
CUBIC	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
Diffusivity	Διαχυτότητα
DISCO	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
ExM	Κλασική Μικροσκοπία Διαστολής
FEA	Finite Element Analysis [Ανάλυση Πεπερασμένων Στοιχείων]
<i>FEBioStudio®</i>	<i>Finite Elements For Biomechanics</i>
FEM	Finite Element Method [Μέθοδος Πεπερασμένων Στοιχείων]
FRUIT	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
Index Matching Gel	Μέσο Εξισορρόπησης Δεικτών Διάθλασης
ISF	Interstitial Fluid [Διάμεσο Υγρό]
LSM	Laser Scanninig Microscopy [Μικροσκοπία Φθορισμού]
MAP	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
Mesh	Πλέγμα
n_{ISF}	Συντελεστής Διάθλασης Διάμεσου Υγρού
n_{scat}	Συντελεστής Διάθλασης Σκεδαστών Ιστού
OA	Oleic Acid [Ελαϊκό Οξύ]
OCAs	Optical Clearing Agents [Παράγοντες Οπτικού Καθαρισμού]
OCT	Optical Coherence Tomography [Οπτική Τομογραφία Συνοχής]
PEGASOS	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
PG	Propylene Glycol [Προπυλενογλυκόλη]

Poisson's ratio	Λόγος Poisson
RI	Refractive Index [Συντελεστής Διάθλασης]
RTF	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
SC	Stratum Corneum [Κεράτινη Στιβάδα]
Scale	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
ScaleS	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
SeeDB	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
SHIELD	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
SWITCH	Μέθοδος Καθαρισμού Ιστών
T_c	Δείκτης Εξίσωσης Bouguer–Beer–Lambert
VE	Viable Epidermis [Βιώσιμη Επιδερμίδα]
Young's modulus	Συντελεστής Young
μ_a	Συντελεστής Απορρόφησης
μ_s	Συντελεστής Σκέδασης
μ_t	Συντελεστής Εξασθένησης