

Функциональная визуализация и оценка скорости диффузии глюкозы в эпителиальных тканях с помощью оптической когерентной томографии*

К.В.Ларин, В.В.Тучин

Функциональная визуализация, мониторинг и количественное описание диффузии глюкозы в тканях эпителия и лежащей под ними стромы in vivo, как и управление оптическими свойствами тканей, исключительно важны во множестве биомедицинских приложений, включая разработку неинвазивных или минимально инвазивных датчиков содержания глюкозы в тканях, а также для терапии и диагностики различных заболеваний, таких как рак, диабетическая ретинопатия и глаукома. В настоящей работе описаны последние достижения в разработке неинвазивного биодатчика молекулярной диффузии на основе метода оптической когерентной томографии (ОКТ). Диффузия глюкозы исследовалась в нескольких эпителиальных тканях как in vitro, так и in vivo. Благодаря способности ОКТ давать послойное изображение тканей с высоким разрешением по глубине, диффузию глюкозы удалось описать в зависимости не только от времени, но и от глубины.

Ключевые слова: глюкоза, проницаемость, неинвазивный метод, разрешение по глубине, оптическая когерентная томография.

1. Введение

Развитие неинвазивных методов функциональной визуализации, мониторинга и оценки транспорта глюкозы в эпителиальных тканях in vivo, а также управление оптическими параметрами ткани крайне важны для множества биомедицинских приложений, включающих терапию, диагностику и усовершенствованную визуализацию новообразований, возникающих при различных тяжелых заболеваниях, таких как рак, артериосклероз, диабет и глаукома. Успешное лечение этих заболеваний связано с длительным употреблением лекарственных препаратов. В отличие от традиционного – перорального – пути приема лекарств, местное трансдермальное введение (методом диффузной доставки) позволяет избежать первого метаболического прохода через печень, влияния кислотной среды пищеварительного тракта, проблем, связанных с пульсациями всасывания в желудке, и т. п. В настоящее время предпочтительным путем приема лекарств в таких случаях признано местное введение через кожу или ткани глаза.

Перспективность введения лекарств через кожу связана с простотой технологии введения, контролируемостью дозы и исключением многих проблем, присущих пероральному или внутривенному способам введения (таких как резкое изменение рН, присутствие ферментов и быстрые флуктуации концентрации препарата в плаз-

ме). Однако через кожу можно вводить лишь ограниченное число лекарственных препаратов, что связано с защитными функциями кожи. Для увеличения проницаемости кожи можно применять некоторые вещества, временно и частично растворяющие липидную основу верхних слоев эпидермиса, а также специальные физиотерапевтические процедуры, увеличивающие скорость диффузии (например, нагревание и электрофорез) [1–3]. Традиционно для оценки поглощения различных лекарств кожей применялись методы in vitro [4]. Необходимость систематического исследования чрескожного введения лекарств in vivo связана с тем, что физические, физиологические и оптические свойства живых тканей могут быть совершенно иными, чем у трупных тканей или послеоперационного материала [5].

Значительные успехи последних лет позволили оптимизировать доставку лекарств к нужным тканям внутри глаза для медикаментозного лечения и диагностики многих глазных болезней [6]. В настоящее время для доставки лекарств к различным сегментам глаза используется четыре основных подхода: системный, внутриглазной, местный и транссклеральный. Успешность системного назначения зависит от конвективного переноса препарата по кровеносным сосудам, диффузии через стенки сосудов и через ткани глаза. Для эффективного лечения нужен систематический прием больших доз, способных преодолеть ограничивающие скорость доставки барьеры [7]. Однако частый прием лекарств в больших дозах может вызывать побочные системные эффекты. Более того, макромoleкулярные препараты (более 4×10^4 а.е.м., а для глобулярных макромoleкул более 7×10^4 а.е.м.) не могут диффундировать сквозь внутреннюю ограничительную мембрану сетчатки [8, 9]. Таким образом, системный путь доставки лекарств в ряде практических случаев неэффективен и редко используется при лечении глазных болезней.

Инъекции в стекловидное тело и вводимые в него имплантаты пролонгированного действия обеспечивают

* Перевод с англ. Э.А.Гениной.

К.В.Ларин. University of Houston, Biomedical Engineering, 4800 Calhoun Rd., N207 Engineering Building 1, Houston, Texas 77204, USA; Саратовский государственный университет им. Чернышевского, Россия, Саратов 410012, ул. Астраханская, 83; e-mail: klarin@uh.edu
В.В.Тучин. Саратовский государственный университет им. Чернышевского, Россия, Саратов 410012, ул. Астраханская, 83; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; e-mail: tuchin@sgu.ru

Поступила в редакцию 13 февраля 2008 г., после окончательного оформления – 13 марта 2008 г.

наиболее прямую доставку терапевтических доз лекарственных препаратов к тканям глаза [10–12]. Однако эти подходы являются существенно хирургическими процедурами и требуют повторных инъекций. Локальная доставка лекарств (ЛДЛ) через роговицу и склеру в настоящее время признана предпочтительным путем их введения для лечения многих глазных болезней [13]. Однако возможности ЛДЛ ограничены низкой проницаемостью многослойных роговицы и склеры, быстрым дренированием слезной жидкостью и поглощением в конъюнктиве. Последние достижения в разработке различных методов ЛДЛ привели к улучшению технологии доставки лекарств путем увеличения контактного времени (например, путем наложения мазей, гелей, использования липосомных технологий приготовления лекарств, применения различных субстратов, обеспечивающих пролонгированное действие и контролируемое выделение препарата) [14]. Все это говорит о том, что ЛДЛ через роговицу и склеру может стать эффективным неинвазивным методом лечения глазных болезней и предпочтительной технологией введения лекарственных препаратов [13–18].

Управление оптическими свойствами тканей является другим важным приложением доставки препаратов (или просветляющих агентов) внутрь эпителиальных тканей [5, 19]. Мутностью биологических тканей можно эффективно управлять с помощью методов оптической иммерсии, основанных на выравнивании показателей преломления рассеивателей и основного материала. Этот подход оказался полезным для повышения контраста изображений живых тканей и получения более точной структурной, функциональной и спектроскопической информации о подлежащих слоях тканей, обычно недоступных для исследования оптическими методами [5, 19–23].

Недавно был разработан новый метод неинвазивной оценки содержания глюкозы в тканях животных и человека, основанный на оптической когерентной томографии (ОКТ) [24–28]. Основой метода является интерферометрическое измерение и анализ распределения амплитуды по глубине образца для низкокогерентного света, отраженного назад от различных слоев и микронеоднородностей ткани. Предварительные исследования на животных и человеке показали, что метод, основанный на ОКТ, позволяет быстро и с высокой чувствительностью оценить изменения концентрации глюкозы в интерстициальной жидкости (ИЖ) кожи. Однако недостаточная точность, вариабельность времени задержки между изменениями концентрации глюкозы в крови и ИЖ, фундаментальные трудности, связанные с разработкой алгоритма калибровки, а также проблемы воспроизводимости могут ограничить применения данного метода на дому и в клиниках.

Ранняя диагностика требуется для успешного терапевтического лечения различных эпителиальных нарушений. Поскольку многие заболевания меняют структурную организацию тканей (например, в результате реконфигурации или модификации коллагеновой структуры, что непосредственно влияет на транспорт молекул в этих тканях), изменения диффузии или проницаемости различных химических соединений и органических молекул, включающих биологически инертные молекулы глюкозы, могут помочь разработке нового объективного метода диагностики различных заболеваний и аномалий ткани.

В настоящей работе описаны результаты исследования по разработке основанной на оптической когерент-

ной томографии (ОКТ) технологии неинвазивного определения локальной молекулярной диффузии в эпителиальных тканях в реальном времени и с высоким пространственным разрешением, что существенно для фундаментальной медицины, клинической практики и фармакологии [29–32].

2. Материалы и методы

Эксперимент проводился с помощью системы ОКТ, в которой использовался низкокогерентный широкополосный источник излучения ближнего ИК диапазона с длиной волны 1310 ± 15 нм и выходной мощностью 3 мВт (ООО «Суперлюминесцентные диоды», Россия). Пучок света, рассеянный образцом, и пучок света, отраженный от зеркала в опорном канале, формировали интерферограмму, которая регистрировалась с помощью фотодиода. Двумерные изображения получались при сканировании падающего пучка по поверхности образца в поперечном направлении и сканировании по глубине (вдоль оси z) с помощью интерферометра. Получаемые изображения состояли из 450×450 пикселей (2.2×2.4 мм). Время получения полного изображения составляло примерно 3 с. Двумерные изображения усреднялись в поперечном направлении (по длине ~ 1 мм, что достаточно для подавления спекл-шума) с формированием одной кривой для сигнала ОКТ, который представляет собой одномерное распределение интенсивности отраженного света по глубине в логарифмическом масштабе.

Эксперименты *ex vivo* и *in vitro* проводились на глазах кроликов и обезьян, а также на коже и коронарной артерии свиньи. Пилотные эксперименты *in vivo* выполнялись на коже обезьяны. Эксперименты проводились в течение 24 ч после энуклеации ткани. При транспортировке и хранении ткани содержались в охлажденном физиологическом растворе подходящей концентрации. Непосредственно перед экспериментами *ex vivo* и *in vitro* ткани помещались в специально разработанную ванночку с физиологическим при нормальной комнатной температуре. Все эксперименты выполнялись при 22°C . Время непрерывного мониторинга оптических свойств ткани при введении различных веществ достигало 2–2.5 ч. По окончании эксперимента ткани помещались в ~ 200 мл физиологического раствора и хранились при $+4^\circ\text{C}$ в течение 12–24 ч. Ткани глаза использовались не более чем в двух экспериментах, а артерии и кожа - в одном. При исследованиях *ex vivo* и *in vitro* были использованы три различных экспериментальных протокола.

Коэффициенты проницаемости глюкозы в тканях рассчитывались двумя различными ОКТ-методами: наклона (ОКТН) и амплитуды (ОКТА) (рис.1). Метод наклона применялся для расчета среднего коэффициента проницаемости \bar{P} стромы. Этот коэффициент вычислялся путем деления толщины исследуемого участка (в типичном случае около 155–255 мкм) на время диффузии агента на данном участке: $\bar{P} = z_{\text{рег}}/t_{\text{рег}}$. Поскольку диффузия глюкозы отражается в изменении сигнала ОКТН, который относительно постоянен как до наложения агента, так и после достижения насыщения, $t_{\text{рег}}$ вычислялось как время насыщения минус время, когда сигнал ОКТН начинал меняться. Метод ОКТА использовался для вычисления коэффициента проницаемости в зависимости от глубины проникновения в ткань: $P(z) = z_1/t_{z_1}$, где z_1 – глубина, на которой проводились измерения (отсчитываемая от

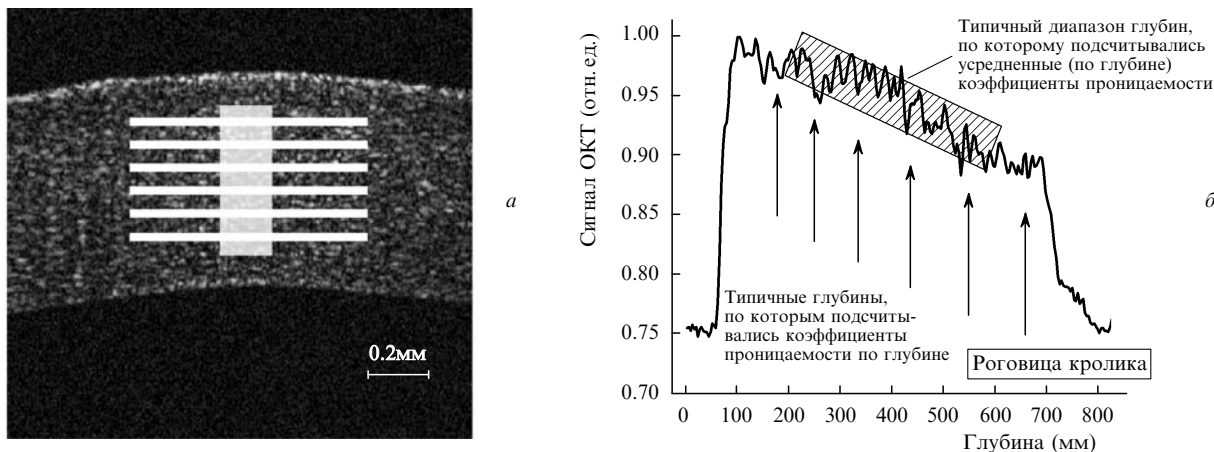


Рис.1. Схема, показывающая основные принципы двух методов, использованных для вычисления коэффициентов проницаемости молекул: двумерная оптическая когерентная томограмма роговицы глаза (а) и соответствующий сигнал ОКТ (б); область применения метода ОКТН отмечена заштрихованным прямоугольником; область применения метода ОКТА показана полосами на оптической когерентной томограмме и стрелками на графике ОКТ-сигнала.

передней поверхности), а t_{z_1} – время диффузии агента на эту глубину. Последнее определялось как время между добавлением агента и началом вызванных агентом изменений амплитуды сигнала ОКТ. Заметим, что, в отличие от метода ОКТН, в данном случае значения z_1 отсчитывались от эпителиальной поверхности ткани до определенной глубины в строме ткани.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.2 показаны типичные результаты, полученные на отделенной склере кролика в ходе эксперимента по диффузии воды. Наклон сигнала ОКТ вычислялся на глубине 105 мкм, отсчитанной от поверхности ткани, в диапазоне глубин 279 мкм. Через 5 минут после начала эксперимента на поверхность склеры однократно наносилась капля воды. Распространение воды внутри склеры меняло локальный коэффициент рассеяния и отражалось в сигнале ОКТ. Рост локальной концентрации воды приводил к уменьшению наклона сигнала ОКТ в процессе гидратации ткани и, наоборот, к его увеличению в про-

цессе пассивной дегидратации склеры (при соприкосновении поверхности склеры с воздухом). Вычисленный коэффициент проницаемости P_{isol}^w составил приблизительно 6.6×10^{-5} см/с в данном эксперименте.

Наклон сигнала ОКТ в зависимости от времени, записанный для роговицы (эксперимент с частично погруженным глазным яблоком) при диффузии глюкозы, показан на рис.3,а. Наклон сигнала ОКТ вычислялся от слоя роговицы 175 мкм на глубине ~350 мкм от поверхности эпителия. Коэффициент проницаемости в этом эксперименте составил 1.62×10^{-5} см/с. Наклон сигнала ОКТ в зависимости от времени, записанный от склеры в опытах по диффузии глюкозы в полностью погруженном глазном яблоке, показан на рис.3,б. Вычисленный коэффициент проницаемости составил приблизительно 5.5×10^{-6} см/с.

Были проведены 55 экспериментов с различными образцами склеры и 52 эксперимента с образцами роговицы кролика. Коэффициенты проницаемости молекул в экспериментах с тканями глаза представлены в нашей работе [30]. Эти результаты хорошо согласуются с опубликованными ранее данными, измеренными другими методами. Например, измеренный коэффициент проницаемости ципрофлоксацина в склере глаза кролика составил $(1.88 \pm 0.62) \times 10^{-5}$ см/с [33]. Для диффузии глюкозы результаты ОКТ хорошо согласуются с полученными для склеры глаза человека методом спектрофотометрии [34].

При сравнении результатов можно заметить, что коэффициенты проницаемости одних и тех же молекул для роговицы и склеры различаются. Это расхождение, скорее всего, вызвано структурными и физиологическими различиями. Гидратация также рассматривается как ключевой фактор в изучении коэффициентов проницаемости химических агентов через биологические ткани. По мере гидратации коллагеновые фибриллы, составляющие основу ткани, расходятся, и расстояние между ними увеличивается [35]. В процессе набухания участвует и другая составляющая ткани – это глюкозаминогликаны (ГАГ), важную роль играют также анионные связи, возникающие в ткани [36, 37]. В склере в 10 раз меньше ГАГ, чем в роговице, и склеральная строма имеет более высокую степень переплетения фибрилл, чем строма роговицы [38]. Поэтому масса набухшей в водном растворе

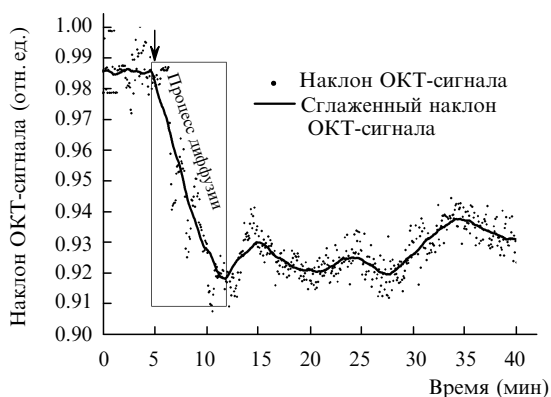


Рис.2. Временная зависимость сигнала ОКТН, записанного для отделенной склеры в ходе эксперимента по диффузии воды, как функция времени. Здесь и на других рисунках стрелкой отмечен момент добавления агента; сглаженный наклон ОКТ-сигнала вычислялся методом усреднения двадцати соседних значений наклонов ОКТ-сигнала (что соответствует приблизительно одной минуте эксперимента).

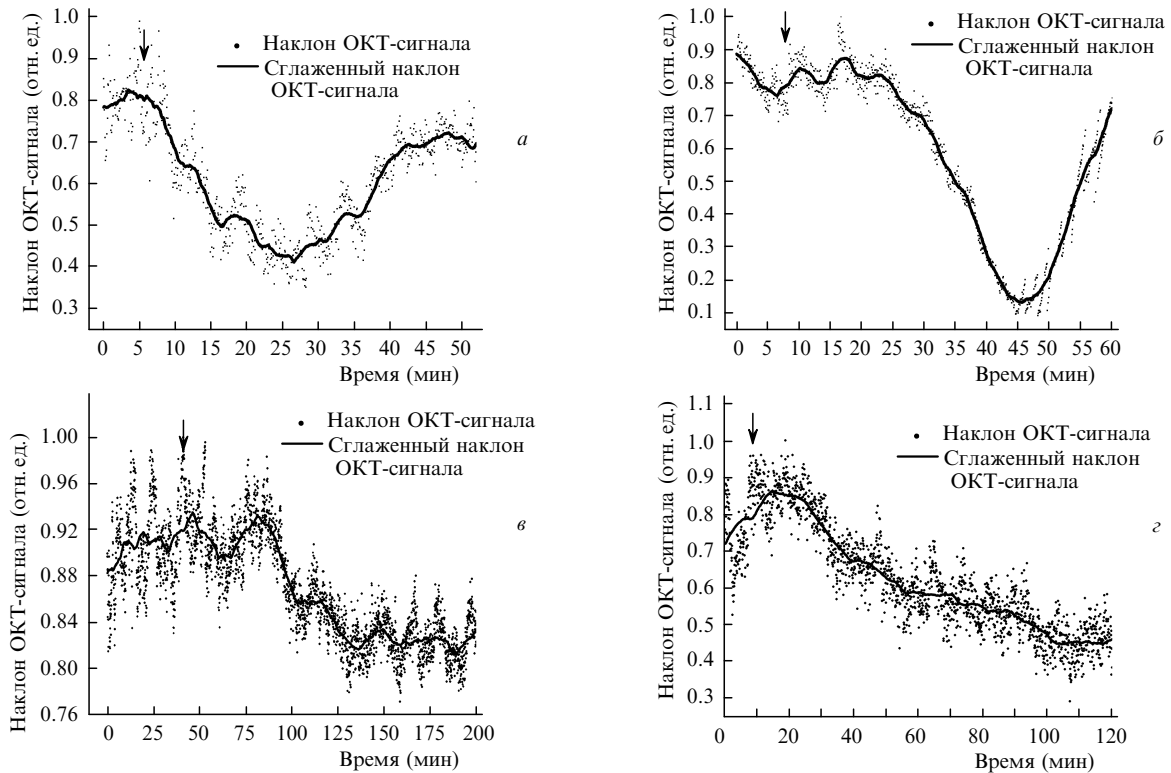


Рис.3. Временная зависимость сигнала ОКТН, записанного в экспериментах по диффузии глюкозы: от роговицы в частично погруженном глазном яблоке (а), от склеры в полностью погруженном цельном глазном яблоке (б), от кожи сви́ньи (in vitro) (в), от кожи обезьяны (in vivo) (г).

роговицы во много раз превышает ее собственную, а гидратация склеры увеличивается лишь на 20 % – 25 % [36]. Показано, что коэффициент проницаемости пропорционален степени гидратации ткани и растет вместе с ней [39].

На рис.3,в показан типичный результат исследования in vitro диффузии глюкозы в коже сви́ньи. Рассчитанный коэффициент проницаемости в этом эксперименте составил примерно 8.95×10^{-6} см/с. Средняя рассчитанная по пяти независимым экспериментам in vitro проницаемость глюкозы в коже сви́ньи составила $(7.69 \pm 0.56) \times 10^{-6}$ см/с.

Были выполнены также пилотные эксперименты in vivo по диффузии глюкозы (20 %) в коже макаки резус (*Macaca mulatta*) (рис.3,г). Хотя типичные слои кожи обезьяны тоньше, чем у человека (например, толщина эпидермального слоя кожи составляет 10–30 мкм у обезьяны и 50–100 мкм у человека), анатомия и физиология их похожи. Все процедуры с обезьянами выполнялись в соответствии с протоколом, одобренным комитетом по защите животных Хьюстонского университета. Животные подвергались анестезии согласно протоколу и фиксировались в специально разработанном держателе для обеспечения неподвижности. Сигналы ОКТ получались от кожи обезьяны в спинной части. Место ОКТ-исследования осторожно выбривалось, датчик ОКТ устанавливался с использованием специального держателя и приклеивался к коже двухсторонней липкой лентой. Через 10–15 мин после начала эксперимента на кожу в месте ОКТ-исследования наносился 20 %-ный раствор глюкозы (~1 мм³). Изменение концентрации глюкозы на различных глубинах в коже отражалось в изменениях наклона сигнала ОКТ (рис.3,г). Рассчитанная по пяти независимым экспериментам in vivo средняя проницаемость для глюкозы в коже составила $(2.32 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ см/с.

Интересные результаты были получены при количественном определении диффузии глюкозы в здоровых и атеросклеротических образцах аорты сви́ньи in vitro. Ткани аорты забирались хирургическим путем от сви́ней с гиперхолестеринемией; эксперименты занимали до 2 ч. Аорты разрезались вдоль и разворачивались, после чего нарезались на квадратные образцы площадью примерно 1 см² с атеросклеротическими изменениями и без них. На рис.4,а представлено типичное поведение ОКТН-сигнала для нормальной аорты сви́ньи в ходе эксперимента по диффузии глюкозы. Исследуемый участок имел толщину около 75 мкм и находился на глубине примерно 280 мкм от эпителиального слоя. Сигнал ОКТН снижался при уменьшении рассеяния в объеме ткани, вызванного повышением концентрации глюкозы. Раствор глюкозы достигал исследуемого участка приблизительно через 5 мин после введения, и еще 15 мин требовалось для того, чтобы он полностью продиффундировал. С этого момента сигнал ОКТ указывал на наличие обратного процесса. Соответствующее изменение наклона может быть связано с диффузией в результате различий градиента концентрации с разных сторон ткани; движение жидкости (преимущественно воды) из областей с высокой концентрацией в области с более низкой концентрацией происходит до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие. Коэффициент проницаемости 20 %-ного раствора глюкозы по результатам четырех независимых экспериментов составил $(6.80 \pm 0.18) \times 10^{-6}$ см/с. График сигнала ОКТН для эксперимента по диффузии глюкозы в атеросклеротической аорте сви́ньи показан на рис.4,б. Использовалась та же процедура, что и для нормальной аорты. Образец наблюдался в течение 7 мин до добавления глюкозы в ванну с физраствором, в котором он находится. Выбранный участок патологической ткани имел протря-

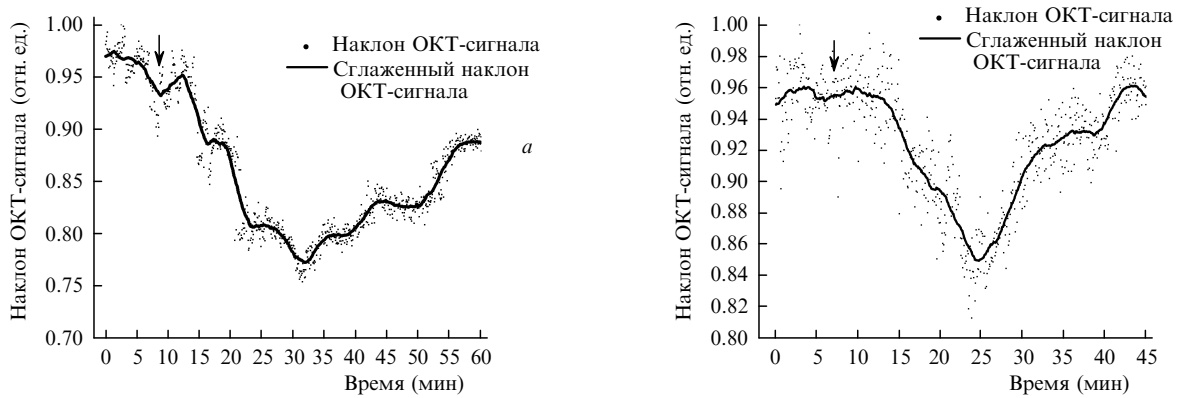


Рис.4. Типичный график зависимости сигнала ОКТН от времени от нормального (а) и пораженного (б) участков образца аорты свиньи.

женность около 140 мкм и находился на глубине 105 мкм от эпителиального слоя. Коэффициент проницаемости 20 %-ной глюкозы в атеросклеротической аорте составлял $(2.69 \pm 0.42) \times 10^{-5}$ см/с.

Результаты данного исследования показывают, что ткань, пораженная атеросклерозом, имеет более высокий коэффициент проницаемости для глюкозы по сравнению со здоровыми участками артерии (рис.5). Это подтверждает гипотезу о том, что данный метод функциональной визуализации, основанный на ОКТ, пригоден как для измерения коэффициента проницаемости глюкозы, так и для распознавания нормальных и патологических участков ткани.

Повышенная скорость, с которой глюкоза диффундирует в атеросклеротическую ткань, может найти анатомическое объяснение. Липопротеины низкой плотности (ЛНП) обычно диффундируют через различные слои ткани аорты, чтобы снова включиться в кровообращение, но иногда связываются во внутренней оболочке (интима) сосуда. Там ЛНП окисляются и модифицируются. Макрофаги мигрируют между эндотелиальными покрытиями интимы и начинают захватывать и пожирать модифицированные ЛНП. Это может приводить к формированию пузырьковых клеток и, в конечном счете, к накоплению бляшек, перекрывающих просвет аорты. По мере того как атеросклеротическая бляшка увеличивается в размере со временем, эластичные ткани, образующие слои аорты, растягиваются, чтобы компенсировать блокирование аорты и поддержать адекватный кровоток по

всему телу. Расширение аорты приводит к изменению организации многочисленных клеток, волокон и тканей аорты. Из-за этих изменений в структуре ткани глюкоза находит более легкий путь проникновения сквозь ткань. Растяжение аорты может объяснить наблюдаемое возрастание коэффициента проницаемости глюкозы в атеросклеротической ткани.

ОКТ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими известными методами визуализации – рентгеновскими, ЯМР и УЗИ – с точки зрения безопасности, стоимости, обеспечиваемого контраста и пространственного разрешения изображений. Однако недостаточная глубина проникновения в ткань является главным недостатком ОКТ. Мутность большинства биологических тканей мешает полному использованию возможностей ОКТ в различных диагностических и терапевтических процедурах. В наших экспериментах исследование диффузии глюкозы проводилось с двойной целью: для количественного определения распределения коэффициента проницаемости по глубине и для просветления среды, чтобы обеспечить доступ излучения к более глубоким слоям тканей и, в конечном счете, расширить диагностические возможности оптических методов.

Коэффициент проницаемости глюкозы был рассчитан в двух различных слоях склеры кролика: в верхних (толщиной 80–100 мкм), включающих эписклеру, и в следующих (толщиной 100 мкм), которые, как считается, попадают в строму или второй слой. По результатам пяти независимых экспериментов было найдено, что коэффициент проницаемости глюкозы равен $(6.01 \pm 0.37) \times 10^{-6}$ см/с в первом слое и $(2.84 \pm 0.68) \times 10^{-5}$ см/с во втором. Кроме того, измеряя в процессе диффузии амплитуду сигнала ОКТ от различных по глубине слоев ткани, мы рассчитали просветляющее действие глюкозы на склеру. Амплитуда сигнала от заданного элемента объема ткани отслеживалась на протяжении всего процесса диффузии, и наблюдаемое изменение амплитуды сигнала позволяло определить оптическое просветление. При этом просветление $B = [(I_1 - I_2)/I_1] \times 100\%$, где I_1 и I_2 – амплитуды сигнала ОКТ от выбранного элемента объема до начала диффузии и после ее окончания. На рис.6 просуммированы результаты экспериментов по относительному просветлению склеры кролика 40%-ным раствором глюкозы, содержание которой измерялось в двух разных местах на различных глубинах. По приблизительной оценке в этих экспериментах первые 100 мкм просветлялись на 10%, а следующие, более глубоко лежащие, 100 мкм – примерно на 17%–22%.

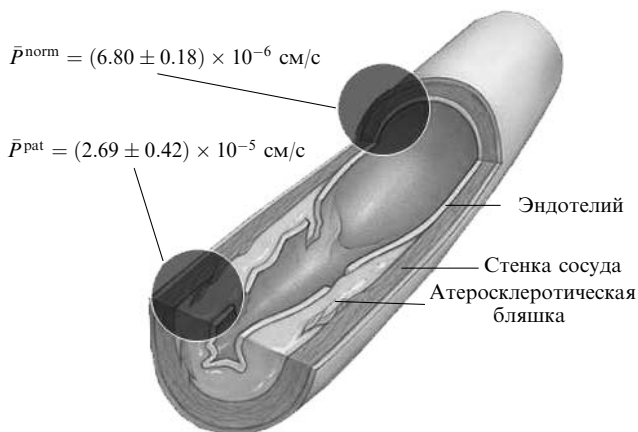


Рис.5. Коэффициенты проницаемости глюкозы, измеренные на образцах аорты в норме и патологии.

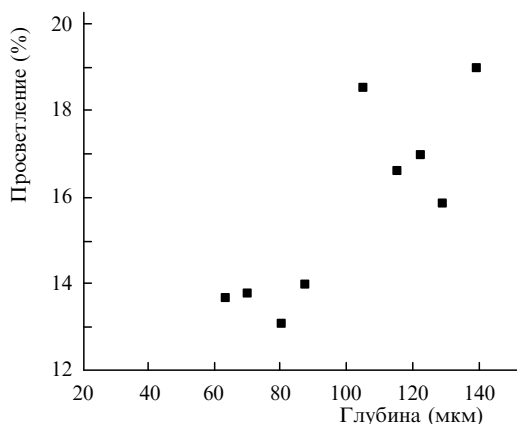


Рис. 6. Оптическое просветление на различных глубинах в склере глаза кролика.

4. Выводы

Представленные экспериментальные результаты демонстрируют возможности метода ОКТ для количественного определения коэффициента проницаемости глюкозы и ее просветляющего действия в различных слоях склеры кролика. Кроме того, из нашего исследования следует, что более глубокие слои склеры просветляются в большей степени, чем наружные. Основной причиной неодинаковой степени просветления различных участков ткани может быть различие размеров коллагеновых волокон и межколлагеновых пространств в различных слоях склеры. Проникновение глюкозы в эписклеру определяется верхним эпителиальным слоем, который хотя и мал по толщине, но, как любой клеточный слой, обладает малой проницаемостью по сравнению с соединительной (фиброзной) тканью и может оказывать заметное влияние на проницаемость эписклеры в целом в сторону замедления диффузии. Сама же эписклера является более плотной фиброзной тканью по сравнению со стромой, что также объясняет различия в скорости диффузии вблизи поверхности (меньшая проницаемость) и в глубине ткани (большая проницаемость). Результаты по просветлению стромы склеры глаза кролика хорошо согласуются с достигнутыми ранее.

Структурные ОКТ-изображения, полученные в наших экспериментах, не позволили эффективно дифференцировать здоровые и патологические ткани. Однако такая дифференциация оказалась эффективной при наблюдении нормальных и аномальных участков ткани (рис.5). Эта информация может существенно повысить специфичность и надежность классификации нормальных и патологических тканей и расширить применение ОКТ в клинической практике. Возможно, что функциональная визуализация на основе ОКТ потенциально пригодна и для более подробной дифференциации различных составляющих развитого атеросклеротического поражения, таких как центральная масса некротизированной ткани и коллаген.

Авторы с благодарностью отмечают вклад в результаты настоящего исследования большой группы студентов и аспирантов, в том числе Mohamad Ghosn, Steven Ivers, Natasha Befru, Esteban Carbajal, Narendran Sudheendran (University of Houston). Исследования были частично поддержаны W.Coulter Foundation и Office of Naval Research, а также Федеральным агентством по образованию Российской Федерации (1.4.06, РНП.2.1.1.4473),

РФФИ (грант № 06-02-16740) и Программой инновационных университетов РФ (ВВТ).

- Jain A.K., Thomas N.S., Panchagnula R. *J. Controll. Release*, **79**, 93 (2002).
- Stott P.W., Williams A.C., Barry B.W. *J. Controll. Release*, **41**, 215 (1996).
- Schaefer H., Redelmeier T.E. *Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption* (Basel: Carger, 1996).
- Kemppainen B.W., Reifenrath W.G. *Methods for Skin Absorption* (Boca Raton: CRC Press, 1990).
- Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2007).
- Davis J.L., Gilger B.C., Robinson M.R. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **6**, 195 (2004).
- Duvvuri S., Majumdar S., Mitra A.K. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **3**, 45 (2003).
- Kamei M., Misono K., Lewis H. *Am. J. Ophthalmol.*, **128**, 739 (1999).
- Marmor M.F., Negi A., Maurice D.M. *Exp. Eye Res.*, **40**, 687 (1985).
- Herrero-Vanrell R., Refojo M.F. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 5 (2001).
- Jaffe G.J., Pearson P.A., Ashton P. *Retina*, **20**, 402 (2000).
- Sanborn G.E., Anand R., Torti R.E., Nightingale S.D., Cal S.X., Yates B., Ashton P., Smith T. *Arch. Ophthalmol.*, **110**, 188 (1992).
- Zhang W.S., Prausnitz M.R., Edwards A. *J. Controll. Release*, **99**, 241 (2004).
- Le Boulrais C., Acar L., Zia H., Sado P.A., Needham T., Leverage R. *Progr. Retinal Eye Res.*, **17**, 33 (1998).
- Ambati J., Gragoudas E.S., Miller J.W., You T.T., Miyamoto K., Delori F.C., Adamis A.P. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **41**, 1186 (2000).
- Olsen T.W., Aaberg S.Y., Geroski D.H., Edelhauser H.F. *Am. J. Ophthalmology*, **125**, 237 (1998).
- Grass G.M., Robinson J.R. *J. Pharmaceutical Sciences*, **77**, 3 (1988).
- Lawrence M.S., Miller J.W. *Intern. Ophthalmology Clinics*, **44**, 53 (2004).
- Tuchin V.V. *Optical Clearing of Tissues and Blood* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2005, Vol. PM154).
- Tuchin V.V., Maksimova I.L., Zimnyakov D.A., Kon I.L., Mavlutov A.H., Mishin A.A. *J. Biomed. Opt.*, **2**, 401 (1997).
- Rylander C.G., Stumpp O.F., Milner T.E., Kemp N.J., Mendenhall J.M., Diller K.R., Welch A.J. *J. Biomed. Opt.*, **11**, 041117-1 (2006).
- Larina I.V., Carbajal E.F., Tuchin V.V., Dickinson M.E., Larin K.V. *Laser Phys. Lett.*, **5**, 476 (2008).
- Vargas G., Chan K.F., Thomsen S.L., Welch A.J. *Lasers Surg. Med.*, **29**, 213 (2001).
- Esenaliev R.O., Larin K.V., Larina I.V., Motamedi M. *Opt. Lett.*, **26**, 992 (2001).
- Larin K.V., Eledrisi M.S., Motamedi M., Esenaliev R.O. *Diabetes Care*, **25**, 2263 (2002).
- Kholodnykh A.I., Petrova I.Y., Larin K.V., Motamedi M., Esenaliev R.O. *Appl. Opt.*, **42**, 3027 (2003).
- Larin K.V., Motamedi M., Ashitkov T.V., Esenaliev R.O. *Phys. Med. Biol.*, **48**, 1371 (2003).
- Larin K.V., Akkin T., Esenaliev R.O., Motamedi M., Milner T.E. *Appl. Opt.*, **43**, 3408 (2004).
- Ghosn M., Tuchin V.V., Larin K.V. *Opt. Lett.*, **31**, 2314 (2006).
- Ghosn M., Tuchin V.V., Larin K.V. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **48**, 2726 (2007).
- Larin K.V., Ghosn M.G., Ivers S.N., Tellez A., Granada J.F. *Laser Phys. Lett.*, **4**, 312 (2007).
- Ларин К.В., Гхосн М. *Квантовая электроника*, **36**, 1083 (2006).
- Ke T.L., Cagle G., Schlech B., Lorenzetti O.J., Mattern J. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **17**, 555 (2001).
- Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Кочубей В.И., Лакодина Н.А., Тучин В.В. *Биофизика*, **48**, 292 (2003).
- Farrell R.A., McCally R.L. in *Principles and Practice of Ophthalmology* (Philadelphia, PA: Saunders, 1994).
- Elliott G.F., Goodfellow J.M., Woolgar A.E. *J. Physiol.*, **298**, 453 (1980).
- Hodson S., Kaila D., Hammond S., Rebello G., al-Omari Y. *J. Physiol.*, **450**, 89 (1992).
- Maurice D.M. *The cornea and the sclera. In The Eye* (New York and London: Academic Press, 1969, Vol. 1).
- Boubriak O.A., Urban J.P., Akhtar S., Meek K.M., Bron A.J. *Exp. Eye Res.*, **71**, 503 (2000).