

Оптическая диагностика сосудистых реакций, вызываемых слабыми аллергенами, методом лазерной спекл-контрастной визуализации

Ю.Л.Кузнецов, В.В.Кальченко, Н.Г.Астафьева, И.В.Меглинский

Рассмотрена возможность применения метода лазерной спекл-контрастной визуализации с длительным временем экспозиции фотодетектора для получения изображения первичной острой сосудистой реакции кожи на локальное воздействие слабого контактного аллергена. Показано, что этим методом может быть эффективно и точно зарегистрирована ирритант-индуцированная первичная острая сосудистая реакция кожи. Представленный метод имеет значительные перспективы в повседневной диагностической практике, доклинических исследованиях, а также для прогноза реакций кожи на взаимодействие с потенциально аллергенными материалами.

Ключевые слова: лазерная спекл-контрастная визуализация, время экспозиции, сосудистая сеть, кожа, контактный ирритант, аллерген.

1. Введение

В последнее время в связи с интенсивным развитием высоких технологий, в частности методов биофотоники, всё более широкое практическое применение находят оптические методы диагностики биотканей [1]. Особое место в задачах биомедицинской оптики занимает разработка и совершенствование методов диагностики кровотока. К числу наиболее известных оптических методов визуализации сосудистого русла и мониторинга кровотока относятся лазерная доплеровская спектроскопия [2], лазерная доплеровская флоуметрия [3], конфокальная микроскопия [4], оптическая когерентная томография (ОКТ) [5], доплеровская ОКТ [6], цветовая доплеровская ОКТ [7], корреляционная ОКТ [8], оптическая доплеровская томография [9], ортогональная поляризация спектральных изображений [10], динамическое рассеяние света [11], диффузионно-волновая спектроскопия [12], лазерная спекл-контрастная (ЛСК) визуализация [13] и др.

Было показано, что метод ЛСК визуализации позволяет регистрировать самые минимальные изменения микроциркуляции кровотока, в том числе при полной остановке сердца и окклюзии сосудов [14]. В настоящее время в сочетании с методом флуоресцентной интравитальной микроскопии (ФИМ) данный метод широко используется для визуализации сосудистого русла кожного покрова

[15, 16], для изучения механизмов регуляции микрогемодинамики и реологических свойств в окружающих опухоль микрососудах и сосудистом русле [17], для изучения микроциркуляции крови и лимфы в естественных условиях [18, 19].

В рамках настоящей работы впервые рассмотрена возможность применения данного метода для прямой визуализации и количественной оценки острой и умеренной кожной реакции на локальное воздействие ирританта. Умеренная реакция кожи на локальное воздействие неспецифического раздражителя или контактного аллергена считается наиболее сложной для идентификации с помощью существующих в настоящее время диагностических методов. При этом стремительный рост числа больных с аллергическими заболеваниями и другими иммунными нарушениями акцентирует внимание исследователей именно на такой тип диагностики с целью изучения причин и способов управления иммуноопосредованными заболеваниями [20]. Разнообразные ксенобиотики, поллютанты, профессиональные сенсибилизаторы, лекарственные препараты и многие другие факторы могут вызывать индивидуальные реакции в организме – от выраженной иммуносупрессии до высокой гиперчувствительности.

Для идентификации опасности сенсибилизации или риска иммуносупрессии совершенствуются доклинические методы оценки риска для человека. Развитие прогностических скрининговых тестов для выявления иммунотоксических воздействий тесно связано с доклиническими исследованиями в модельных экспериментах с использованием лабораторных животных.

В течение нескольких десятилетий в испытаниях сенсибилизирующего действия использовались морские свинки. Для формирования у них реакций гиперчувствительности применяются два типа индукционной экспозиции: адьювантная, в которой сенсибилизация инициируется введением аллергена с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ), и неадьювантная. Контрольная экспозиция аллергена может осуществляться парентерально и аппликационно. Метод требует больших временных затрат, для

Yu.L.Kuznetsov, V.V.Kalchenko. Department of Veterinary Resources, Weizmann Institute of Science, Rehovot, 76100, Israel

Н.Г.Астафьева. Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Россия, 410012 Саратов, ул. Большая Казачья, 112
И.В.Меглинский. The Jack Dodd Centre for Quantum Technologies, Department of Physics, University of Otago, PO Box 56, Dunedin 9054, New Zealand; Научно-образовательный институт оптики и биофотоники Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: igor.meglinski@otago.ac.nz

Поступила в редакцию 10 марта 2014 г.; после доработки – 11 мая 2014 г.

стандартизации используется оценка реакций по описательной шкале полученных изменений в баллах у контрольных и опытных животных. Оптимизированная модель в настоящее время известна как Максимизационный тест на морских свинках (Guinea Pig Maximization Test (GPMТ)) [21].

При определенных обстоятельствах для получения необходимой информации о сенсибилизации могут использоваться другие экспериментальные животные. Принимая во внимание тот факт, что 99% генов мышей схожи с человеческими, а также ввиду относительно низкой стоимости, лёгкости содержания, высокой скорости размножения и небольших размеров, на сегодняшний день в качестве лабораторных животных наиболее часто используются мыши [22]. В связи с этим иммунная система мыши была исследована более подробно, чем иммунная система морской свинки. Более того, с развитием технологий генной инженерии в настоящее время существует возможность создавать, фактически на заказ, генетически модифицированных мышей с наличием степени определенно заболевания [22].

Для оценки сенсибилизационного потенциала на мышах были разработаны модели, обладающие рядом преимуществ, в частности возможностью объективной оценки конечного результата испытания, малой продолжительностью и минимальной процедурой обработки животных. Это, например, метод оценки изменений в локальных лимфатических узлах (Local Lymph Node Assay (LLNA)) [23].

Однако наиболее перспективным в настоящее время можно считать тест по оценке степени отека уха мыши (Mouse Ear Swelling Test (MEST)) [24]. Этот тест, разработанный в начале 1980-х гг. для обеспечения более низкой стоимости, более короткой по времени и объективной регистрации, стал альтернативой тестам с использованием моделей на морских свинках.

В силу простоты реализации и возможности относительно быстрого получения результатов во многих биологических и доклинических исследованиях принято считать MEST своего рода «золотым стандартом» неинвазивного аллергического теста, который широко используется в повседневной практике для тестирования новых антиаллергических материалов [24, 25]. В ходе данного теста исследуемое вещество (потенциальный аллерген) наносится на кожу уха мыши *in vivo*. Иммунная реакция организма на вещество определяется как степень отека, количественные оценки которой производятся по результатам измерения толщины уха мыши в месте нанесения вещества. Наличие или степень отека кожи в месте нанесения аллергена могут быть соотнесены с аллерген-индуцированным локальным воспалением, раздражением и реакцией гиперчувствительности. К сожалению, у MEST имеются довольно жесткие ограничения, а именно: высокая вариабельность при использовании небольших доз аллергенов, сложность количественной оценки сильной аллергической реакции и др. [25].

В то же время с помощью MEST можно оценивать активность не только сенсибилизаторов и аллергенов, но и любых воздействий, меняющих микроциркуляцию. При условии стандартизации и повышения чувствительности метода сфера применения MEST может быть существенно расширена. Тест используется для оценки воспалительного ответа в доиммунных реакциях, при действии раздражителей или провоспалительных препаратов [26–28]. Указанные реакции ассоциированы с локальными гемо-

дисциркуляторными процессами (нарушением кровообращения), обусловленными изменением микроциркуляции крови, объёма крови в сосудистом русле, её реологических свойств или выходом крови за пределы сосудов [29–31]. Как следствие, локальная скорость движения кровотока в микрососудах существенно меняется во времени. Возможны ситуации, когда микропотоки полностью останавливаются, а затем начинают движение в обратную сторону. Иными словами, время корреляции флуктуирующих спектров изменяется, как для всякого случайного нестационарного процесса. В связи с этим для получения изображения первичной острой сосудистой реакции кожи на локальное воздействие контактного аллергена мы использовали метод ЛСК визуализации с длительным временем экспозиции фотодетектора, хорошо зарекомендовавший себя в изучении сложных нестационарных микроциркуляций кровотока и лимфотока *in vivo* [14, 18, 19].

2. Методика проведения эксперимента

Используемая экспериментальная установка для ЛСК визуализации является частью мультимодальной оптической диагностической системы, схематически представленной на рис.1. Уникальность данной диагностической системы заключается в том, что она позволяет одновременно использовать оба режима визуализации, ЛСК и ФИМ, в естественных условиях [15–19].

В режиме ЛСК визуализации используется модуль лазерного диода LDM 808/3 LJ (808 нм, 3 мВт, Roithner Lasertechnik, Австрия). Лазерный пучок проходит через диффузор Thorlabs – Newton (США) и освещает ухо мыши. Спеклы, возникающие в результате отражения диффузно рассеянного лазерного света, регистрируются при помощи высококачественной ПЗС-камеры Pixelfly QE (PCO, Германия), позволяющей осуществлять захват изображения с различным временем экспозиции в диапазоне от 33 до 650 мс. Захват последовательности изображений (обычно 300) и управление камерой осуществляются посредством стандартного программного обеспечения CamWare (PCO, Германия). Обработка и анализ последовательностей изображений реализован на основе специального программного пакета обработки изображений eLSI для Fiji/ImageJ [32].

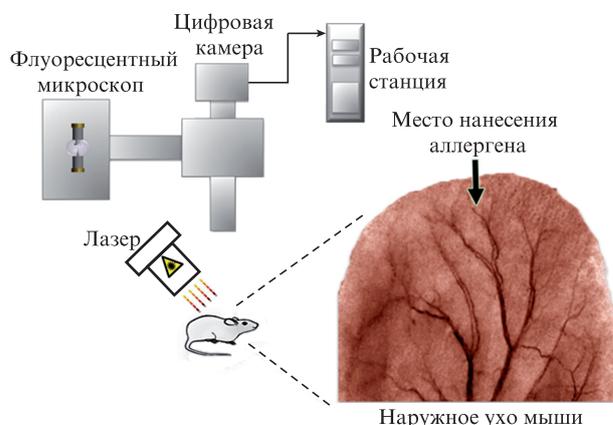


Рис.1. Схема эксперимента. Поверхность уха мыши в месте локального применения метилсалицилата одновременно освещается ртутной лампой флуоресцентного микроскопа и диффузно рассеянным лазерным светом. Детектирование изображения в режимах ЛСК визуализации и/или ФИМ осуществляется ПЗС-камерой, управляемой персональным компьютером.

Метод ЛСК визуализации основан на статистическом анализе флуктуаций интенсивности лазерного излучения, рассеянного биологической тканью, которая содержит такие движущиеся, рассеивающие свет частицы, как эритроциты и лимфоциты. При наличии кровотока и лимфотока, и следовательно, движения рассеивающих частиц, интенсивность рассеянного лазерного излучения флуктуирует, образуя нестационарные спекл-картины, меняющиеся во времени. Количественно движение рассеивающих свет частиц анализируется по степени контраста спеклов [33]:

$$K(T) = \sigma / \langle I \rangle, \tag{1}$$

где σ – стандартное отклонение от средней интенсивности $\langle I \rangle$ в заданной точке спекл-картины. Степень контраста спеклов является функцией времени экспозиции детектора T и времени корреляции τ , обратно пропорционального средней скорости движения рассеивающих частиц, и может быть представлена в виде [34]

$$K = \left\{ \beta \rho^2 \frac{\exp(-2x) - 1 + 2x}{2x^2} + 4\beta \rho(1 - \rho) \frac{\exp(-x) - 1 + x}{x^2} + \nu \right\}^{1/2}, \tag{2}$$

где $x = T/\tau$; параметр β определяется отношением среднего размера спекла к размеру пикселя на детекторе ($0 \leq \beta \leq 1$) и зависит от степени поляризации и когерентности зондирующего лазерного излучения; ρ – порционная составляющая динамически рассеянного света (т.е. света, рассеянного на движущихся частицах); ν – пространственно-дисперсионный параметр, определяющий погрешность эксперимента, включая шумовые характеристики детектора (ПЗС-камеры в нашем случае), дробовый шум, стабильность лазера и т.д. В случае практического использования методики ЛСК визуализации для диагностики и визуализации кровотока параметры T и x обычно не принимаются во внимание. Априори считается, что T превышает τ ($T > \tau$). Однако при длительном времени экспозиции детектора ($T \gg \tau$) чувствительность метода ЛСК визуализации еще более возрастает [18, 19]. В настоя-

щей работе мы использовали метод ЛСК визуализации с большим временем экспозиции детектора ($T = 650$ мс).

В режиме ФИМ, в отличие от ЛСК, в качестве источника света используется специально предназначенная для флуоресцентных микроскопов ртутная лампа с короткой дугой. Корректируемый посредством оптического фильтра с окном прозрачности 460–490 нм свет направляется через дихроичное зеркало на ту же поверхность уха мыши, что и в методе ЛСК визуализации. Детектируемый флуоресцентный свет попадает через полосовой оптический фильтр с окном прозрачности 510–550 нм на матрицу ПЗС-камеры (см. рис.1). Для получения флуоресцентного изображения кровеносных сосудов наружного уха мыши в режиме ФИМ предварительно осуществляется внутривенная инъекция 50 мкл декстрана FITC (0.5 М, 10 мг/мл). В экспериментах использовались самки «голых» мышей (nude линии CD-1 из лаборатории Harlan (Реховот, Израиль)) в возрасте 6–8 недель. После анестезии, осуществляемой посредством внутривенной инъекции смеси кетамина (Fort Dodge, США) и ксилазина (Керго, Нидерланды) из расчета 10 мг/кг и 100 мг/кг соответственно, животное помещалось на обогреваемую платформу с термоконтроллером. Во избежание возможных произвольных движений животного во время эксперимента наружное ухо мыши фиксировалось двухсторонней клейкой лентой.

Несмотря на принципиальное различие используемых оптических методов диагностики, области пространственной локализации детектируемых сигналов ЛСК визуализации и ФИМ-метода оказываются практически одинаковыми (рис.2). Приведенные на рис.2 распределения получены методом Монте-Карло (МК) [35, 36], специально разработанным для оценки плотности вероятности пространственного распределения (локализации) детектируемого оптического сигнала в исследуемой, рассеивающей свет среде для существующих в настоящее время экспериментальных установок с возможностью осуществлять расчеты дистанционно.

Пространственное распределение детектируемого сигнала называется объемом выборки. В общем случае объем выборки зависит от оптических свойств биотканей и будет различным при разных пространственных положе-

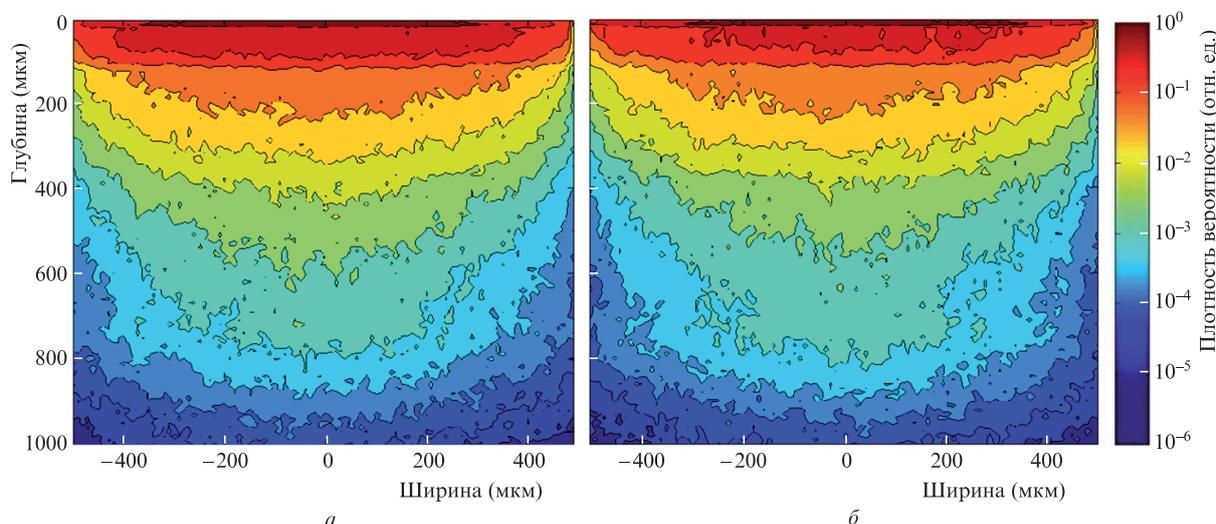


Рис.2. Пространственные распределения области локализации детектируемого сигнала в приповерхностных тканях кожи уха мыши, рассчитанные методом Монте-Карло [35, 36] для ЛСК визуализации (а) и ФИМ (б).

ниях источника и детектора оптического излучения. Показано, что если объем выборки J представить как функцию глубины r' в среде, то его можно интерпретировать как меру (условно, функцию плотности вероятности) чувствительности измерения на поверхности среды для исследуемого объема ткани, расположенного на глубине r' [37]. Тогда объем выборки определяется как

$$J(r_q, r_m, r') = \frac{\partial A(r_q, r_m)}{\partial \mu_a(r')}, \quad (3)$$

где $\partial \mu_a(r')$ – изменение коэффициента поглощения на глубине r' , а $\partial A(r_q, r_m)$ – изменение амплитуды затухания в точке детектора с координатой r_m при условии, что источник излучения находится в точке с координатой r_q . Амплитуда затухания определяется как

$$A(r_q, r_m) = -\ln\left(\frac{I(r_m)}{I_0(r_q)}\right). \quad (4)$$

Здесь $I_0(r_q)$ – интенсивность падающего излучения в точке с координатой r_q , а $I(r_m)$ – интенсивность обнаруженного отраженного излучения в точке с координатой r_m . Объемная (3) и (4), получаем

$$J(r_q, r_m, r') = -\frac{1}{I(r_m)} \frac{\partial I(r_m)}{\partial \mu_a(r')}. \quad (5)$$

Таким образом, объем выборки определяется как градиент удельного потока излучения, регистрируемого детектором, по отношению к коэффициенту поглощения небольшого объема $\delta V(r')$ среды на глубине r' . Функция $J(r')$ характеризует полное пространственное распределение детектируемого оптического излучения в среде и определяется пространственным распределением эффективных оптических путей. Для гетерогенной среды, состоящей из нескольких однородных компонент с различными оптическими параметрами, например из нескольких оптически однородных слоев кожи, компонента объема выборки имеет вид [38]

$$J_k(r') = -\frac{1}{I(r_m)} \frac{\partial I(r_m)}{\partial \mu_{ak}(r')}, \quad (6)$$

где μ_{ak} – коэффициент поглощения k -го слоя среды. Объем выборки $J_k(r')$ равен средней длине пробега фотонов $\bar{L}(r')$ оптического излучения, проходящего через небольшой объем $\delta V(r')$.

Численное моделирование методом МК является наиболее оптимальным методом оценки плотности вероятности распределения эффективных оптических путей (т.е. объема выборки). Разработанная методика МК [35, 36] содержит концепцию статистического веса (меры заданной траектории пакета фотонов), позволяющую описать естественный путь движения фотонов в среде. Это обеспечивает возможность ввести при расчетах понятие эффективных оптических путей. После того как пакет фотонов попадает на детектор, его траектории от источника до детектора взвешиваются по его окончательному статистическому весу W . Разбив моделируемую среду на элементарные объемы, характерный размер которых составляет $10 \times 10 \times 10$ мкм, и проследив траекторию каждого пакета фотонов от объема к объему, можно выразить объем выборки следующим образом:

$$J(r') = -\frac{1}{I(r_m)} \frac{\partial I(r_m)}{\partial \mu_{ak}(r')} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{ph}} L_i(r') W_{di}(r_m)}{l_0 \sum_{i=1}^{N_{ph}} W_{di}(r_m)}. \quad (7)$$

Здесь W_{di} – конечный вес i -го обнаруженного пакета фотонов; N_{ph} – общее число детектируемых пакетов фотонов; $L_i(r')$ – длина пути, пройденного i -м пакетом фотонов в элементарном объеме с центром на глубине r' ; l_0 – размер этого объема.

Таким образом, объем выборки (см. рис.2) представляет собой двумерную прямоугольную сетку $J(x, z)$, полученную из 3D распределения $J(r')$, где x – горизонтальная ось (ширина), а z – глубина. Для определения длины пути в элементарном объеме был реализован алгоритм на основе метода Козна–Сазерленда отсечения линии. Более подробно методика расчета $J(r')$ представлена и обсуждается в работе [38].

3. Результаты и их обсуждение

Положительная реакция теста LLNA наблюдается в результате воздействия на кожу уха мыши раствором метилсалицилата в течение 30 мин в естественных условиях (рис.3). Воздействие метилсалицилатом осуществлялось локально на кожу наружного уха мыши, и в конечном счете сосудистая реакция была идентифицирована как отчетливо наблюдаемый отек тканей. Хорошо виден процесс выхода флуоресцентного контрастного вещества за пределы сосудистого русла и его накопление в окружающих тканях наружного уха в месте воздействия контактного ирританта. В данной работе основное внимание было сфокусировано на возможности количественной оценки острой сосудистой реакции на локальное воздействие на кожу уха мыши метилсалицилатом без предварительной сенсibilизации.

Установлено, что острая сосудистая реакция на воздействие аллергена/ирританта на ранних стадиях проявляется в повышенной сосудистой проницаемости, что вызывает массивный отток плазмы из капилляров в близлежащие интерстициальные пространства, вазодилатацию и отек [39]. Это существенно снижает кровоток в мелких сосудах, таких как вены, артериолы и капилляры. Показано, что замедление движения эритроцитов на ранних стадиях этого процесса можно эффективно наблюдать методом ЛСК визуализации [14, 15]. В действительности, отежная реакция – не единственный процесс, происходящий в результате увеличения проницаемости кровеносных сосудов. В большинстве случаев воспалительный процесс, в том числе и аллергическая реакция, вызывает местную лимфатическую дисфункцию, которая характеризуется замедлением лимфотока, лимфедемой и др. [39, 40]. В работах [18, 19] было показано, что метод ЛСК визуализации с большим временем экспозиции детектора является чувствительным к локальным изменениям интенсивности лимфотока и может быть использован для визуализации последнего. Представленные на рис.3 результаты также получены методом ЛСК визуализации с использованием длительного времени экспозиции ($T = 650$ мс) и хорошо согласуются с результатами упомянутых выше исследований.

Учитывая тот факт, что мониторинг проницаемости сосудов может оказаться ключевым моментом в рамках

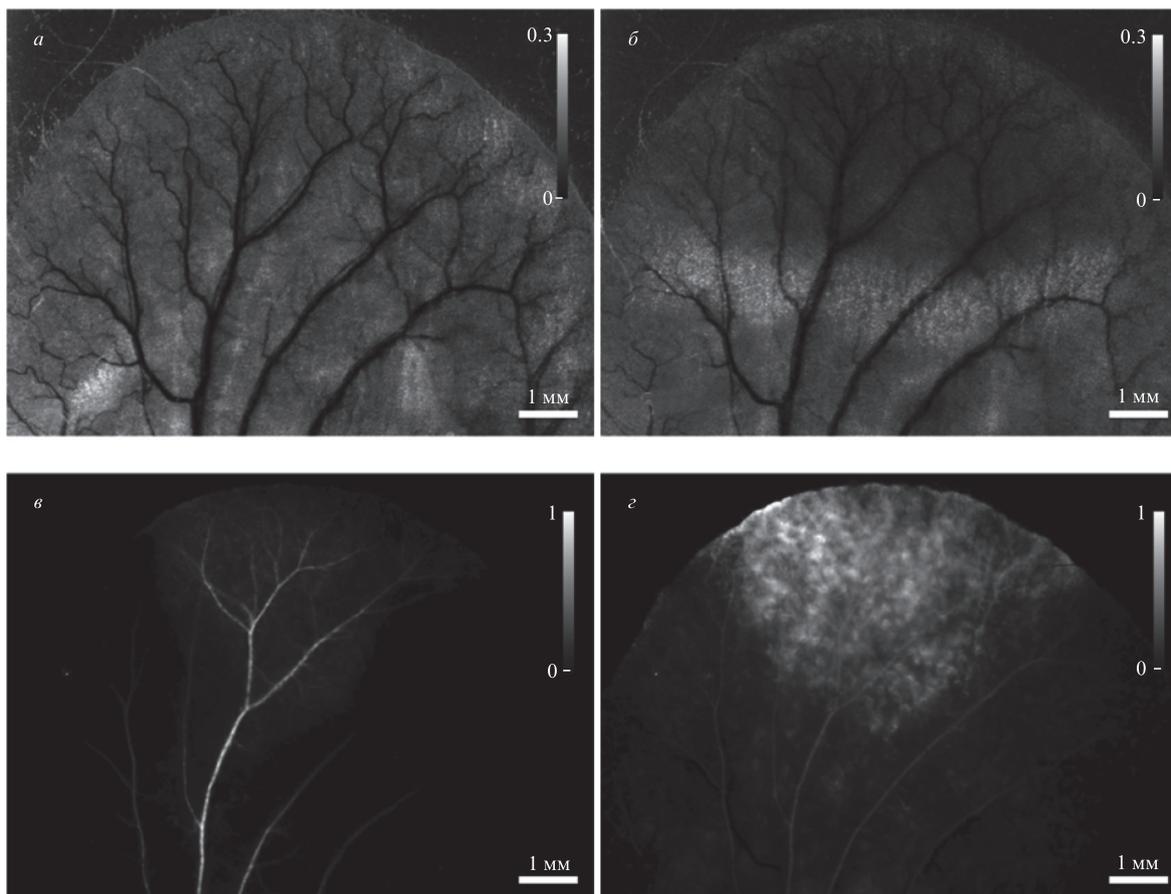


Рис.3. Монохромные изображения уха мыши *in vivo*, полученные методом ЛСК визуализации с длительным временем экспозиции детектора (650 мс) в нормальных условиях (а) и через 30 мин после локальной аппликации метилсалицилата (б) (малые значения спекл-контраста (шкала интенсивности, темный цвет) соответствуют увеличению кровотока), а также изображения, полученные ФИМ-методом с внутривенной инъекцией декстрана FITC до (в) и после (з) локальной аппликации метилсалицилата.

оценки острой сосудистой реакции, а также для верификации результатов, полученных методом ЛСК визуализации, мы повторно провели эксперимент с использованием визуализации ФИМ-методом. Повышенная проницаемость сосудов была отчетливо видна через 30 с после введения декстрана FITC. Она выглядит как светлая область (рис.3,з), расположенная в окрестности кровеносных сосудов. Таким образом, результаты визуализации реакции кожного покрова уха мыши на воздействие ирританта (потенциального аллергена или сенсibilизирующего агента), полученные ФИМ-методом, подтверждают результаты ЛСК визуализации.

4. Заключение

В работе показано, что метод ЛСК визуализации с большим временем экспозиции детектора ($T \approx 650$ мс) может быть использован для неинвазивного наблюдения острой сосудистой реакции кожи на воздействие метилсалицилата. Режим визуализации ФИМ в рамках данного эксперимента используется в основном в качестве проверочного метода. Полученные результаты демонстрируют существенный потенциал разработанной методики для внедрения в повседневную практику доклинических исследований. Метод также имеет значительные перспективы в повседневной диагностической практике для оценки контактной гиперчувствительности, прогноза реакций кожи на потенциальные аллергены, сенситизаторы и на

взаимодействие с широким спектром ксенобиотиков, веществ, загрязняющих окружающую среду, различных химикатов, лекарственных препаратов и других материалов, которые можно использовать для аппликации. Метод поможет прогнозировать трансдермальный транспорт лекарственных препаратов и оценивать эффективность трансдермальных лекарственных форм.

Следует также отметить сравнительную простоту и относительную дешевизну практического внедрения метода ЛСК визуализации в повседневную клиническую практику. Авторы выражают уверенность, что адаптация описанной методики к повседневной практике аллергических тестов, проводимых на коже человека, позволит использовать меньшее количество аллергена за счет высокой чувствительности метода ЛСК визуализации.

Работа выполнена при поддержке Lewis Family Trust (VK) и Weizmann Institute of Science (Israel).

Авторы также выражают благодарность университету Отаго, Новая Зеландия (PBRF Research Output Publishing Grant).

1. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (М.: Физматлит, 2010).
2. Приезжев А.В., Романовский Ю.М. *Квантовая электроника*, **5** (10), 2237 (1978).
3. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. *Лазерная доплеровская флуориметрия микроциркуляции крови* (М: Медицина, 2005).
4. Rajadhyaksha M. et al. *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 946 (1995).
5. Bonesi M. et al. *Laser Phys.*, **20**, 891 (2010).

6. Bonesi M. et al. *J. Innovative Opt. Health Sci.*, **2**, 431 (2009).
7. Izatt J.A. et al. *Opt. Lett.*, **22**, 1439 (1997).
8. Doronin A., Meglinski I. *Laser Photonics Rev.*, **7**, 797 (2013).
9. Chen Z. et al. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **5**, 1134 (1999).
10. Messmer K. *Orthogonal Polarization Spectral Imaging, Progress in Applied Microcirculation* (Basel: Karger, 2000).
11. Fine I. et al. *Laser Phys.*, **22**, 469 (2012).
12. Meglinski I., Tuchin V.V., in *Handbook of Coherent-Domain Optical Methods. Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring and Material Science*. Ed. by V.V.Tuchin (New York: Springer, 2012, Vol. 1, ch.3, pp 149–166).
13. Boas D.A., Dunn A.K. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 011109 (2010).
14. Меглинский И.В. и др. *Докл. РАН*, **451**, 393 (2013).
15. Kalchenko V. et al. *Laser Phys. Lett.*, **7**, 603 (2010).
16. Кузнецов Ю.Л., Кальченко В.В., Меглинский И.В. *Квантовая электроника*, **41** (4), 308 (2011).
17. Kalchenko V. et al. *J. Biophotonics*, **4**, 645 (2011).
18. Kalchenko V. et al. *J. Biomed. Opt.*, **17**, 050502 (2012).
19. Кальченко В.В., Кузнецов Ю.Л., Меглинский И.В. *Квантовая электроника*, **43** (1), 679 (2013).
20. Adkinson N.F. Jr. *Middleton's Allergy: Principles and Practice* (Philadelphia, PA: Mosby Elsevier, 2008).
21. Basketter D.A. et al. *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 65 (1992).
22. Rosenthal N., Brown S. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 993 (2007).
23. Montelius J. et al. *Acta Derm. Venereol.*, **78**, 433 (1998).
24. Gad S.C. et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 93 (1986).
25. Garrigue J.L. et al. *Contact Dermatitis*, **30**, 231 (1994).
26. Anderson S.E. et al. *Toxicol. Sci.*, **127**, 371 (2012).
27. Gerbeix C. et al. *Toxicol. Sci.*, **134**, 39 (2013).
28. Moallem S.A. et al. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, **16**, 1238 (2013).
29. Мчедлашвили Г.И. *Микроциркуляция крови: Общие закономерности регуляции и нарушений* (Л.: Наука, 1989).
30. Куприянов В.В., Караганов Я.Л., Козлов В.И. *Микроциркулярное русло* (М.: Медицина, 1975).
31. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. *Микроциркуляция* (М.: Медицина, 1984).
32. Schindelin J. et al. *Nat. Methods*, **9**, 676 (2012).
33. Briers J.D. et al. *J. Biomed. Opt.*, **4**, 164 (1999).
34. Parthasarathy A.B. et al. *Opt. Express*, **16**, 1975 (2008).
35. Doronin A., Meglinski I. *Biomed. Opt. Express*, **2**, 2461 (2011).
36. Doronin A., Meglinski I. *J. Biomed. Opt.*, **17**, 090504 (2012).
37. Arridge S. *Appl. Opt.*, **34**, 7395 (1995).
38. Меглинский И.В., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Чурмаков Д.Ю., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **32** (10), 875 (2002).
39. Emanuel M.B. *Clin. Exp. Allergy*, **29**, 1 (1999).
40. Miteva D.O. et al. *Circ Res.*, **106**, 920 (2010).