

Лазерно-индуцированная модификация коллагенового каркаса склеры для изменения ее гидравлической проницаемости

Н.Ю.Игнатьева, О.Л.Захаркина, Е.А.Сергеева, Е.Н.Иомдина

Рассмотрено воздействие импульсов ИК лазерного излучения с длиной волны 1.56 мкм умеренной интенсивности и раз- ной длительности на структуру коллагенового каркаса и проницаемость склеральной ткани. Показано, что темпера- турные пороги денатурации коллагена в ткани при лазерном облучении существенно снижены по сравнению с порога- ми при традиционном однородном нагреве в печи калориметра. На изображениях, полученных с помощью нелинейной оптической микроскопии в режиме генерации второй гармоники, наблюдается модификация матрикса ткани при тем- пературах ниже порога денатурации. Модификация имеет свои особенности при продолжительном (длительностью более 1 с) и коротком (10–30 мс) воздействии: разделение пучка волокон на группы с искажением их хода в первом случае и разволокнение пучка на хаотично направленные волокна во втором. Характер изменения ткани определяет из- менение коэффициента диффузии органического вещества в толщу ткани. После аморфизации матрикса (денатурации коллагена) или искажения хода групп волокон в пучке коллагена коэффициент диффузии уменьшается на 10%–40%, а после разволокнения пучка возрастает на 25%–50% по сравнению со значением $(3 \pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$, характерным для intactной ткани. Полученные результаты позволяют предположить, что специфическая дезорганизация колла- генового каркаса ткани при короткоимпульсном воздействии может в перспективе найти применение для увеличения проницаемости склеральной ткани.

Ключевые слова: ИК лазерное воздействие, модификация коллагена, диффузия, нелинейная оптическая микроскопия.

1. Введение

ИК лазерное излучение умеренной интенсивности ус- пешно применяется в клинической медицине для измене- ния механических свойств хрящевых тканей. Неоспоримым достоинством лазерного воздействия является контроль размера зоны изменений и степени поражения ткани [1]. В научной медицинской литературе обсуждалась возмож- ность использования неабляционного ИК лазерного воз- действия на ткани глаза с целью изменения его рефрак- ции [2, 3] или увеличения оттока внутриглазной жидкости [4, 5]. Однако оказалось, что при этом в зонах лазерного воздействия происходят изменения (денатурация колла- гена и коагуляция ткани) в матриксе роговицы и склеры. Последствия этих изменений могут быть нежела- тельными, и проблема максимально щадящей и эффек- тивной реализации лазерно-индуцированных изменений физико-химических характеристик тканей глаза остается актуаль- ной. Решение этой задачи может иметь важное научно- практическое значение для современной офтальмологии. Прежде всего, увеличение проницаемости склеры рассма-

тривается в качестве перспективного подхода к нехи- рургическому лечению глаукомы, поскольку при этой оф- тальмопатологии значительно нарушается трабекуляр- ный отток внутриглазной жидкости (ВГЖ), что является ключевым фактором повышения внутриглазного давления и развития инвалидирующей глаукомной оптической нейропатии [6]. Хотя увеосклеральный отток и трансскле- ральная диффузия ВГЖ в норме являются дополнитель- ными механизмами ее циркуляции в глазу, однако при нарушении трабекулярного оттока значение именно этих – транссклеральных – путей становится определяющим в поддержании гидродинамики. В то же время при разви- тии глаукомного поражения коллагеновый матрикс скле- ры существенно уплотняется, что снижает ее гидравличе- скую проницаемость [7]. Кроме того, нарушение нормаль- ной проницаемости склеры препятствует полноценной транссклеральной доставке инстиллируемых в конъюн- ктивальную полость лекарственных веществ и тем самым снижает эффективность медикаментозной терапии различ- ных заболеваний глаз, в том числе гипотензивной терапии глаукомы [8].

Коагуляция ткани неизбежно сопровождается денату- рацией коллагена и аморфизацией матрикса. При лазер- ном нагреве, однако, при температурах ниже порога де- натурации коллагеновый каркас претерпевает специ- фическую модификацию, которая заключается в нарушении упорядоченной укладки волокон и фибрилл. Такая дезор- ганизация наблюдалась в тканях роговицы [9], кожи [10] и связки [11]. Если наличие зон коагуляции в тканях глаза крайне нежелательно, то низкотемпературную модифи- кацию каркаса склеры можно использовать, например, для целенаправленного изменения ее физико-химических свойств, в частности дозированного увеличения гидрав- лической проницаемости.

Н.Ю.Игнатьева. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: n.yu.ignatieva@gmail.com

О.Л.Захаркина. Институт фотонных технологий ФНИЦ «Крис- таллография и фотоника» РАН, Россия, 108840 Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2

Е.А.Сергеева. Федеральный исследовательский центр «Институт прикладной физики» РАН, Россия, 603950 Н.Новгород, ул. Улья- нова, 46

Е.Н.Иомдина. Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца, Россия, 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19

Поступила в редакцию 23 ноября 2020 г.

Цель настоящей работы – определение возможности изменения проницаемости склеры при низкотемпературной модификации ткани под действием ИК лазерного излучения.

Лазерная обработка склеры проводилась одноимпульсным ИК излучением ($\lambda = 1.56$ мкм) разной длительности. Характерная глубина проникновения излучения в ткань составляет ~ 0.8 мм [12], поэтому вся толщина склеры [13, 14] подвергается лазерному воздействию. Существует несколько подходов к оценке транспорта органических веществ в ткань склеры, причем во всех случаях авторы связывали измеряемое свойство с концентрацией вещества в склере, затем на основе простой модели диффузии в пористую среду [15] определяли количественную характеристику проницаемости. Более сложные методы оценки концентрации связаны с регистрацией динамики изменений оптических свойств склеры и расчетом показателя преломления в процессе транспорта вещества в склеру [16, 17]. Простые методы основаны на определении изменения концентрации веществ в растворах, соприкасающихся со склерой [18–20], или в склере [21]. В настоящей работе измерялось количество красителя, которое диффундировало из его раствора в толщу склеры через заданное время, и рассчитывался коэффициент диффузии красителя в качестве количественной оценки проницаемости. Изменение проницаемости склеры мы связывали с изменением коллагенового каркаса ткани, состояние которого оценивали с помощью нелинейной лазерной оптической микроскопии (НЛОМ) в режиме регистрации генерации второй гармоники (ГВГ).

2. Материалы и методы

Материалы. Были исследованы глазные яблоки кроликов в возрасте не более 12 месяцев post mortem. Глазное яблоко отделяли от прилежащих тканей, хранили при 4°C и использовали в течение 36 часов после энуклеации. Полоски склеры шириной 3 мм и длиной 11 мм вырезали по окружности глазного яблока, отступив от лимба на 1.5–2 мм.

Лазерная обработка. Для воздействия использовался эрбиевый волоконный лазер ЛС-1.56-5 (ИРЭ-Полус, Россия), излучающий на длине волны $\lambda = 1.56$ мкм со стабильной мощностью в диапазоне 0.3–4.5 Вт в импульсном режиме. Длительность импульса варьировалась от 0.01 до 10 с. Излучение лазера подводилось оптическим волокном диаметром 600 мкм (числовая апертура 0.2). Одноимпульсное воздействие осуществлялось в двух режимах: длинным импульсом (длительность более 1 с) и коротким импульсом (10–30 мс). В первом случае ткань облучалась при мощности 1.4 Вт дистанционно: торец волокна находился на расстоянии 12.0 ± 0.5 мм от поверхности, при этом диаметр облучаемой зоны составлял 3.0 ± 0.1 мм. Обработку излучением полоски склеры осуществляли одним рядом лазерных пятен так, что расстояние между центрами двух соседних пятен составляло 1.5 мм. Такой способ облучения обеспечивает более равномерное температурное воздействие на ткань. Воздействие в короткоимпульсном режиме осуществлялось контактно при мощности 0.3–1 Вт, диаметр облучаемой зоны соответствовал диаметру волокна. Обработку излучением полоски склеры в этом случае проводили с использованием двух рядов лазерных пятен, расстояние между двумя соседними пятнами было ~ 1.5 мм.

Температурные измерения в отдельных экспериментах выполнялись методом ИК термографии с помощью тепловизора FLIRA655*sc (FLIR Systems, США) с частотой кадров до 200 Гц и объектива FOL25. Для обработки термограмм использовалось программное обеспечение FLIR Research IR Max. На основе пространственно-временных температурных распределений определена связь между длительностью импульса лазера и максимальной температурой (T_{\max}) на поверхности образца при облучении длинными импульсами и подповерхностной температурой в короткоимпульсном режиме. При варьировании длительности импульса от 1 до 3 с плотность энергии излучения E изменялась от 0.2 до 0.59 Дж/мм², и, как следствие, T_{\max} изменялась от 50 до 62 °C. В режиме коротких импульсов плотность энергии $E = 0.021–0.071$ Дж/мм² и рост температуры составлял не более 20 °C от комнатной. Детальное описание схем температурных измерений при дистанционном и контактном облучении приведено в работах [10] и [22] соответственно.

Термический анализ. Термическое поведение образцов в диапазоне температур 20–90 °C изучалось на дифференциальном сканирующем калориметре Phoenix DSC 204, (Netzsch, Германия) (ДСК-анализ) при скорости нагрева 10 К/мин. Непосредственными результатами измерения являлись характеристики эндотермы денатурации коллагена [23]: температура пика $T_{\text{peak}} = 62.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$ (соответствует исчезновению остатков нативного коллагена), температура начала денатурации $T_{\text{beg}} = 60 \pm 0.6^\circ\text{C}$ и площадь области денатурации – энтальпия денатурации коллагена $\Delta H_d = 27.1 \pm 5.3$ Дж/г сухой ткани. Эти данные находятся в согласии с результатами ДСК-анализа коллагенсодержащих тканей [24].

Степень денатурации коллагена α рассчитывалась по уменьшению теплового эффекта денатурации ΔH коллагена в облученных образцах по сравнению с энтальпией плавления коллагена в интактных образцах ΔH_d (т. е. до лазерного воздействия):

$$\alpha = \left(1 - \frac{\Delta H}{\Delta H_d}\right) \times 100\%.$$

Нелинейная оптическая микроскопия. ГВГ-визуализацию образцов проводили с использованием системы лазерной сканирующей микроскопии LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение осуществлялось импульсным фемтосекундным излучением титан-сапфирового лазера MaiTai HP (Spectra Physics, США) на длине волны 800 нм с длительностью импульсов 100 фс и частотой следования 80 МГц. Сигнал ГВГ выделяли с помощью дихроичного фильтра видимого излучения КР650 (Carl Zeiss) и узкополосного фильтра (380–465 нм). Для визуализации фиксированные в формалине препараты помещали между покровными стеклами. ГВГ-изображение среза, содержащее 1024 × 1024 пикселей, формировалось с помощью масляно-иммерсионного объектива EC-Plan-Neofluar Oil DIC M27 (Carl Zeiss) с увеличением 40/1.3, поле зрения составляло 225 × 225 мкм. Каждая линия изображения усреднялась по 8 сканам для улучшения отношения сигнал/шум.

Определение коэффициента диффузии. Толщина образцов d измерялась при помощи лабораторного микроскопа, оснащенного цифровой камерой; образец помещался между покровными стеклами толщиной 100 мкм и располагался вертикально в плоскости, параллельной оп-

тической оси микроскопа. Оценку проницаемости склеры проводили с использованием красителя сафранина О ($C_{20}H_{19}ClN_4$, молярная масса $M = 350.84$ г/моль). Образцы помещались в раствор красителя (концентрация $C_0 = 0.0005$ М) на время 20 минут, после чего их промокали для удаления излишков влаги, еще раз определяли площадь S и толщину d образца и выдерживали в 1 мл раствора 0.15 М NaCl при 80°C для осуществления полной денатурации коллагена. Затем добавляли 0.5 мл раствора трипсина (3 мг/мл) и оставляли на сутки в термостате при температуре 37°C , полученную взвесь центрифугировали. В растворе над осадком определяли концентрацию красителя с использованием градуировочной зависимости для сафранина О на максимуме поглощения ($\lambda = 520$ нм) и затем рассчитывали общее количество красителя в образце $m(t)$ с учетом объема раствора над осадком (1.5 мл). Равновесное количество красителя $m(\infty)$ в образце склеры объемом $V = Sd$ рассчитывали по форму-

ле $m(\infty) = C_0MV_s$ в предположении, что коэффициент проницаемости склеры $s = 0.8$ [17].

Проницаемость материала оценивалась количественно на основе модели пассивного транспорта вещества (красителя) из раствора с концентрацией C_0 в помещенную в этот раствор плоскую пластину толщиной d . В первом приближении можно принять [17], что в момент времени t количество красителя внутри пластины $m(t)$ соотносится с равновесным количеством $m(\infty)$ как $m(t)/m(\infty) = 1 - \exp(-t/\tau)$, где τ – характерное время диффузии. В рамках используемой модели коэффициент диффузии красителя в материал пластины связан с величиной τ уравнением $D = d^2/(\pi^2\tau)$.

Подробное обоснование применимости общих законов диффузии (пассивного транспорта) для описания диффузии веществ в биотканях (и в склере, в частности) как пористой среде представлено в работе [25]. Блок-схема предварительного эксперимента для выбора режимов воздействия и основного эксперимента приведены на рис. 1.

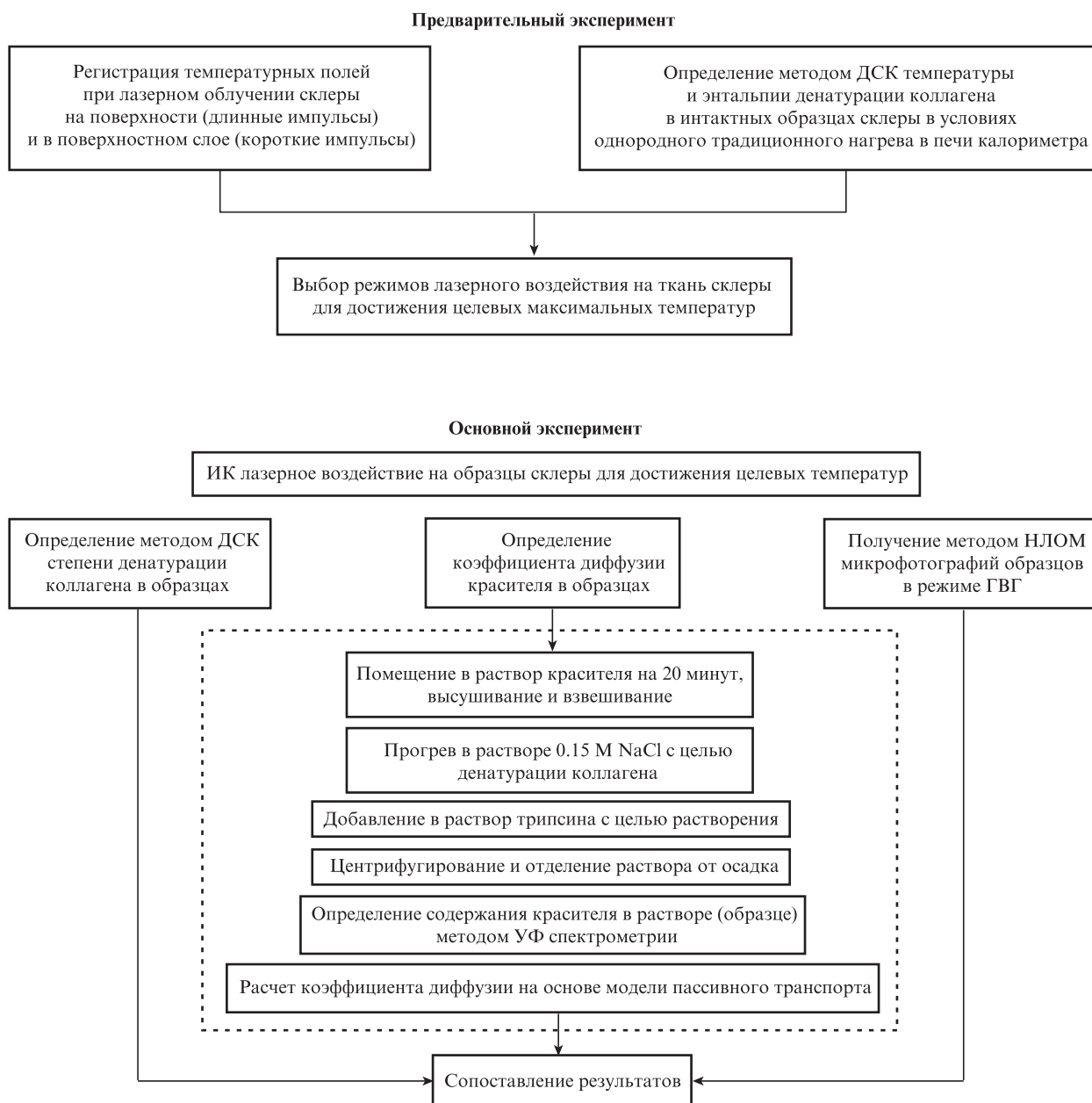


Рис. 1. Блок-схема последовательности экспериментальных исследований.

3. Полученные результаты

ИК лазерное воздействие в режиме длинного импульса.

По мере возрастания плотности энергии E максимальная температура на поверхности ткани увеличивалась, и, начиная с ее порогового значения, происходила денатурация коллагена (см. табл.1). Оказалось, что денатурация коллагена при ИК лазерном нагреве склеры начинается при более низкой температуре (на 1–2 градуса ниже 55 °С), чем в условиях однородного традиционного нагрева в печи ДСК-калориметра.

Табл.1. Степень денатурации коллагена склеры α при разных плотностях энергии лазерного излучения E и продолжительностях длинного импульса τ_p .

E (Дж/мм ²)	τ_p (мс)	T_{\max} (°С)	α (%)
0.23	1.16	50±0.5	0
0.29	1.44	52±0.5	0
0.36	1.83	55±0.5	менее 5
0.42	2.10	57±0.5	43±1.0
0.50	2.54	60±0.5	70±1.0
0.58	2.93	62±0.5	100

Были определены коэффициенты диффузии D для облученных образцов, в которых денатурация коллагена не произошла ($T_{\max} = 50$ °С), денатурация произошла частично ($T_{\max} = 55$ °С) или полностью ($T_{\max} = 60$ °С). Оказалось, что во всех случаях значения D были меньше, чем в интактных образцах, причем уменьшение становилось тем заметнее, чем выше T_{\max} (табл.2). Отметим, что значение коэффициента D при диффузии красителя в толщу склеры находится в разумном согласии со значением D других органических соединений, с учетом разницы молекулярных масс диффундирующих веществ и точности оценки их концентраций [17–21].

Табл.2. Изменение коэффициента D при диффузии красителя в толщу склеры после ИК лазерного нагрева ткани в режиме длинного импульса.

T_{\max} (°С)	D (10 ⁻⁶ см ² /с)	T_{\max} (°С)	D (10 ⁻⁶ см ² /с)
Интактный образец	3.0±0.1	55	2.3±0.1
50	2.7±0.2	60	1.8±0.2

Воздействие в режиме короткого импульса. С целью изменения характера модификации коллагенового каркаса и одновременного предотвращения возникновения обширных областей аморфизации склеры использовалось контактное воздействие на ткань существенно меньшей длительности и чередование зон воздействия с интактными зонами. Обнаружено, что даже при минимальной мощности излучения ИК лазера (0.3 Вт) в ткани происходит денатурация коллагена, если длительность импульса равна или превышает 30 мс. Поскольку после аморфизации ткани ее проницаемость падает, последующие исследования выполнялись при длительностях импульса 10 и 20 мс. В табл.3 представлены данные по регистрируемым максимальным температурам и степени денатурации коллагена α .

Табл.3. Степень денатурации коллагена склеры α при разных плотностях энергии лазерного излучения в режиме короткого импульса.

E (Дж/мм ²)	τ_p (мс)	T_{\max} (°С)	α (%)
0.021	20	25±0.5	0
0.036	10	32±0.5	0
0.043	20	35±0.5	24±1.0
0.057	20	36±0.5	25±1.0
0.071	20	43±0.5	24±1.0

Отметим, что в случае контактного одноимпульсного воздействия на поверхность анализируемого образца в нескольких точках размером, равным диаметру волокна, корректно можно обсуждать лишь наличие или отсутствие денатурации коллагена, но не ее степень α . Тем не менее можно утверждать, что в случае импульсного облучения температурный порог денатурации коллагена снижен по сравнению с таковым при квазинепрерывном лазерном нагреве (и снижен еще более по сравнению с традиционным однородным нагревом в печи калориметра).

Коэффициенты диффузии D были определены как для облученных образцов, в которых денатурация коллагена не произошла ($T_{\max} = 25$ и 32 °С), так и для образцов, где она произошла частично ($T_{\max} = 36$ °С). Оказалось, что значения D в образцах, где не обнаружен денатурированный коллаген, превышали соответствующие значения, полученные в интактных образцах. В образцах с частичной денатурацией коллагена значения D были меньше, чем у интактных образцов (см. табл.4). Таким образом, образцы, модифицированные коротким импульсом ИК лазерного излучения, характеризовались большим значением D .

Табл.4. Изменение коэффициента D при диффузии красителя в толщу склеры после ИК лазерного нагрева ткани в режиме короткого импульса.

T_{\max} (°С)	D (10 ⁻⁶ см ² /с)	T_{\max} (°С)	D (10 ⁻⁶ см ² /с)
Интактный образец	3.0±0.1	32±0.5	3.8±0.1
25±0.5	4.6±0.1	36±0.5	2.5±0.2

ИК лазерное воздействие, которое не приводило к денатурации коллагена (по данным термического анализа), инициировало, тем не менее, изменение коллагенового каркаса облученной склеры по сравнению с интактной тканью. В последней коллагеновые волокна собраны в пучки, расположенные параллельно склеральной поверхности. Ход волокон однообразный в пределах пучка – слегка волнистый с редкими остроугольными кримпами (рис.2, а). После облучения склеры в режиме длинного импульса (при условии, что температура не превышает 50–52 °С) волокна в пределах пучка делились на группы. В пределах группы ход волокон оставался одинаковым, но направление постоянно менялось справа налево и сверху вниз. При этом как волокна в группах, так и сами разнонаправленные группы плотно примыкали друг к другу (рис.2, б).

После облучения склеры в режимах короткого импульса, не приводящих к денатурации коллагена (см. табл.3), происходило разделение пучка на волокнистые структуры, хаотично расположенные друг относительно друга.

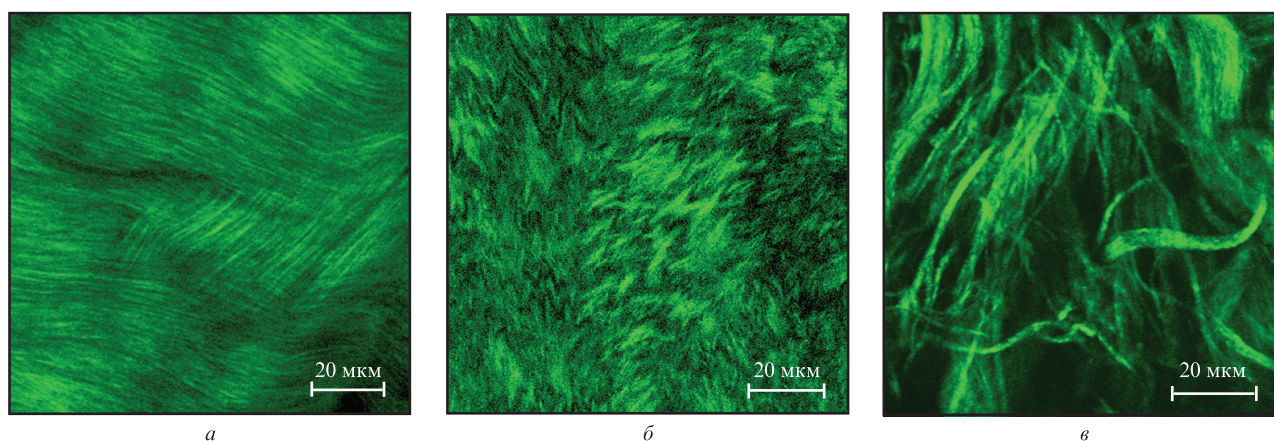


Рис.2. Типичные ГВГ-изображения ткани склеры: интактная (а) и после лазерного воздействия в режиме длинного (б) и короткого (в) импульса.

Некоторые структуры разукрупнились, вплоть до отдельных волокон. При таком распаде коллагенового каркаса явно визуализировались промежутки между отдельными волокнистыми структурами (рис.2, в).

4. Обсуждение результатов

Изменения матрикса склеры при его ИК лазерном нагреве характеризовались двумя особенностями: снижением температуры денатурации коллагена и предденатурационной модификацией коллагенового матрикса ткани. Мы наблюдали подобные явления при ИК лазерном воздействии на ткань кожи [10] и объяснили их с помощью фототермомеханического эффекта лазерного нагрева. Этот эффект обусловлен большой скоростью нагрева и его пространственной неоднородностью, что приводит к потокам жидкости и локальным искажениям волокнистых структур. Специфическая дезорганизация коллагеновой сетки ткани, происходящая при лазерном нагреве до температур ниже температуры денатурации, была идентифицирована на ГВГ-микрофотографиях облученных образцов роговицы [9] и связки [11]. В модифицированном матриксе коллагеновый каркас оказывается дестабилизированным, и превращение трехспиральной макромолекулы коллагена в конформацию случайного клубка облегчается. Проявление фототермомеханического эффекта усиливается при импульсном нагреве, когда возможны механические повреждения третичной, вторичной и, возможно, первичной структуры белка.

Денатурация коллагена сопровождается аморфизацией матрикса, приводящей к заметному уменьшению коэффициента диффузии. По всей вероятности, в интактном матриксе движение интерстициальной жидкости происходит преимущественно в пространстве между упорядоченными пучками. После гомогенизации матрикса свободный объем для потока воды исчезает, и гидравлическая проницаемость ткани склеры снижается.

В образцах склеры, коллагеновый каркас которой специфически модифицирован с помощью короткоимпульсного ИК лазерного воздействия, коэффициент диффузии возрастает. Мы полагаем, что увеличение гидравлической проницаемости ткани связано с тем, что после разделения пучка на мелкие разнонаправленные волокнистые структуры (вплоть до отдельных волокон – так называемое разволокнение) происходит увеличение свободного объема, равномерно распределенного в зоне воз-

действия. Как следствие, возрастает возможность беспрепятственного движения жидкости в направлении, перпендикулярном плоскости пучка. В условиях большего нагрева ткани с увеличением длительности облучения механическое воздействие становится более мягким, а сами изменения коллагенового каркаса носят более упорядоченный и крупномасштабный характер; соответственно, не отмечается и увеличения гидравлической проницаемости (и ее количественной характеристики – коэффициента диффузии D). Можно предположить, что незначительное уменьшение D обусловлено искажением волокнистых структур, сопровождающимся уменьшением пространства для потоков интерстициальной жидкости.

Отметим, что модификация коллагенового каркаса склеры и вызываемое ею увеличение проницаемости ткани получены при ИК лазерном облучении в режимах, не приводящих к денатурации коллагена и коагуляции ткани. Действительно, при контактном воздействии зона изменений хорошо контролируется и ограничивается площадью торца волокна, подводящего излучение. Рост температуры в центре пятна не превышает 10°C , что в совокупности с коротким временем воздействия (10–20 мс) дает надежду на отсутствие значительных повреждений в большинстве клеток.

5. Заключение

Итак, показано, что при ИК лазерном нагреве склеры денатурация коллагена происходит при более низких температурах, чем в условиях традиционного однородного нагрева в печи калориметра, причем еще до денатурации происходит модификация коллагенового каркаса ткани. При воздействии лазерного импульса длительно 10–20 мс эта модификация сводится к разволокнению коллагенового пучка и обуславливает увеличение коэффициента диффузии органических веществ в склере. Такое контролируемое и малоинвазивное ИК лазерное воздействие может в перспективе найти применение для увеличения проницаемости склеральной ткани при определенных офтальмопатологиях.

1. *Лазерная инженерия хрящей*. Под ред. В.Н.Баграташвили, Э.Н.Соболя, А.Б.Шехтера (М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006).
2. Brinkmann R., Kampmeier J., Grotehusmann U., Vogel A., Koop N., Asiy-Vogel M., Bimgruber R. *Proc SPIE*, **2681**, 56 (1996).

3. Соболев Э.Н., Большунов А.В., Воробьева Н.Н., Омельченко А.И., Захаркина О.Л., Игнатъева Н.Ю., Гроховская Т.Е., Лунин В.В. *Квантовая электроника*, **32**, 909 (2002) [*Quantum Electron.*, **32**, 909 (2002)].
4. Аветисов С.Э., Большунов А.В., Хомчик О.В., Фёдоров А.А., Сипливиый В.И., Баум О.И., Омельченко А.И., Щербаков Е.М., Панченко В.Я., Соболев Э.Н. *Национальный журнал глаукома*, **14**, 5 (2015).
5. Baum O.I., Sobol E.N., Bolshunov A.V., Fedorov A.A., Khomchik O.V., Omelchenko A.I., Shcherbakov E.M. *Lasers Surg. Med.*, **46**, 46 (2014).
6. La Rosa F.A., Lee D.A. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **11**, 90 (2000).
7. Boote C., Sigal I.A., Grytz R., Hua Y., Nguyen T.D., Girard M.J.A. *Prog. Retin. Eye Res.*, **74**, 100773 (2020).
8. Kim J.-W., Lindsey J.D., Wang N., Weinreb R.N. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 1514 (2001).
9. Matteini P., Ratto F., Rossi F., Cicchi R., Stringari C., Kapsokalyvas D., Pavone F.S., Pini R. *Opt. Express*, **17**, 4868 (2009).
10. Ignatieva N., Zakharkina O., Dadasheva A., Shekhter A., Sviridov A., Lunin V. *J. Biophotonics*, **12**, e201960024 (2019).
11. Захаркина О.Л., Сергеева Е.А., Кириллин М.Ю., Игнатъева Н.Ю. *Квантовая электроника*, **50**, 76 (2020) [*Quantum Electron.*, **50**, 76 (2020)].
12. Ignatieva N.Y., Zakharkina O.L., Andreeva I.V., Sobol E.N., Kamensky V.A., Myakov A.V., Averkiev S.V., Lunin V.V. *Photochem. Photobiol.*, **83**, 675 (2007).
13. Савицкая Н.Ф., Винецкая М.И., Иомдина Е.Н. *Вестник офтальмологии*, **98** (4), 26 (1982).
14. Беспалюк Ю.Г., Демидова М.Ю., Кузнецова Е.А., Обрубов А.С. В кн. *Экспериментальная офтальмология: морфологические основы новых технологий лечения*. Под ред. С.А.Обрубова, Г.В.Ставицкой, И.Б.Медведева, А.А.Древалы (М.: БИНОМ, 2011, с. 6).
15. Котык А., Яначек К. *Мембранный транспорт* (М.: Мир, 1980).
16. Ghosn M.G., Tuchin V.V., Larin K.V. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**, 2726 (2007).
17. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Кочубей В.И., Лакодина Н.А., Тучин В.В. *Биофизика*, **48**, 309 (2003).
18. Konrádsdóttir F., Loftsson T., Sigfússon S.D. *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 121 (2009).
19. Miao H., Wu B.-D., Tao Y., Xiao-Xin Li X.-X. *Acta Ophthalmol.*, **91**, e1 (2013).
20. Lin C.-W., Wang Y., Challa P., Epstein D.L., Yuan F. *Mol. Vis.*, **13**, 243 (2007).
21. Boubriak O.A., Urban J.P.G., Akhtar S., Meek K.M., Bron A.J. *Exp. Eye Res.*, **71**, 503 (2000).
22. Sviridov A.P., Zakharkina O.L., Ignatieva N.Y., Vorobieva N.N., Bagratashvili N.V., Plyakin V.A., Kulik I.O., Sarukhanyan O.O., Minaev V.P., Lunin V.V., Bagratashvili V.N. *Lasers Surg. Med.*, **46**, 302 (2014).
23. Shau Yu. *Thermal Anal. UserCom.* (Mettler-Toledo), **2**, 6 (2007).
24. Баграташвили В.Н., Захаркина О.Л., Игнатъева Н.Ю., Лунин В.В. *Лазеро-индуцированные и термические процессы в модификации структуры соединительных тканей* (Долгопрудный: Изд. дом «Интеллект», 2016).
25. Тучин В.В. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях* (Саратов: изд-во СГУ, 1998).