

20 Апробация тонкоигольного оптического зонда для регистрации изменений флуоресценции коферментов клеточного дыхания

© К.Ю. Кандурова¹, Е.В. Потапова¹, Е.А. Жеребцов^{1,2}, В.В. Дрёмин^{1,2}, Е.С. Серёгина¹,
А.Ю. Винокуров³, А.В. Мамошин^{1,4}, А.В. Борсуков⁵, Ю.В. Иванов^{6,7}, А.В. Дунаев¹

¹ Научно-технологический центр биомедицинской фотоники, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, 302026 Орел, Россия

² University of Oulu, 90570 Oulu, Finland

³ Кафедра промышленной химии и биотехнологии, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, 302026 Орел, Россия

⁴ Орловская областная клиническая больница, 302028 Орел, Россия

⁵ Проблемная научно-исследовательская лаборатория „Диагностические исследования и малоинвазивные технологии“, Смоленский государственный медицинский университет, 214006 Смоленск, Россия

⁶ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682 Москва, Россия

⁷ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, 107564 Москва, Россия

e-mail: kandkseniya@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2019 г.

В окончательной редакции 31.01.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Описано устройство для оптической биопсии с каналом флуоресцентной спектроскопии и тонкоигольным оптическим зондом для применения при тонкоигольной пункционно-аспирационной биопсии новообразований печени. Для апробации разработанного устройства проведены экспериментальные измерения флуоресценции внутренних органов лабораторной крысы *in vivo* при воздействии на поверхности тканей митохондриального разобщителя для индуцирования изменений клеточного дыхания. Полученные результаты постановочного эксперимента показали способность разработанного канала регистрировать изменения флуоресценции, обусловленные изменениями в процессах окислительного фосфорилирования митохондрий.

Ключевые слова: оптическая биопсия, флуоресцентная спектроскопия, митохондриальные разобщители, НАДН, ФАД.

DOI: 10.21883/OS.2020.06.49405.32-20

Введение

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания являются второй ведущей причиной смерти в мире [1]. Одним из труднодиагностируемых видов онкопатологии является рак печени. Первичный рак печени является шестым по распространенности в мире и четвертым по летальности среди остальных видов злокачественных новообразований [2,3]. При этом наблюдается тенденция к увеличению числа зарегистрированных случаев данного заболевания [4,5]. Также известно, что печень является органом, в котором чаще всего возникают метастазы, обусловленные злокачественными новообразованиями в других органах [6]. Одним из факторов, улучшающих прогноз у пациентов с опухолями печени, является возможность более ранней диагностики.

Несмотря на современный технический и методологический уровень медицины, диагностика рака печени до сих пор вызывает определенные трудности. „Золотым стандартом“ предоперационной диагностики злокачественных опухолей является гистологическое и цитологическое исследование образцов тканей и клеток [7]. Для их получения проводится процедура тонкоигольной пункционно-аспирационной биопсии (ТПАБ) [8,9], при которой образец ткани извлекается из нескольких зон исследуемого патологического очага с помощью тонкой иглы с обычным или режущим краем под контролем таких методов визуализации, как ультразвуковое исследование, компьютерная томография или магнитно-резонансная томография. Среди преимуществ данной процедуры отмечаются мининвазивность, атравматичность, низкая вероятность возникновения осложнений, высокая точность и экономическая эффективность [10].

Материал, полученный во время ТПАБ, отправляется на плановое гистопатологическое и цитологическое исследования, результаты которых врач-хирург получает только через 5–10 дней после процедуры, в то время как получение информации о состоянии тканей пораженного органа в этот период представляет интерес с точки зрения выбора тактики дальнейшего лечения. Другой проблемой метода является вероятность забора неинформативного материала из-за ряда причин: физиологическое смещение органов, манипуляции, предшествующие ТПАБ, произвольные движения пациента, недостаточная визуализация очага новообразования из-за его небольших размеров и гетерогенности. Указанные выше факторы приводят к тому, что даже опытные хирурги допускают до 15–29% недиагностических образцов [11–13]. Ложноотрицательный результат приводит к необходимости повторной процедуры, что может быть связано с риском развития осложнений для пациента и увеличивает длительность лечения. Таким образом, для повышения эффективности лечения пациентов со злокачественными новообразованиями печени актуальной задачей является разработка и внедрение новых методов диагностики, позволяющих получать информацию в режиме реального времени.

Одной из быстро развивающихся областей приложения биомедицинской оптики для решения задач хирургии являются методы оптической биопсии [14], которые объединяют в себе преимущества традиционной биопсии и компенсируют ее главный недостаток — необходимость изъятия образца ткани и значительные затраты времени на анализ. Оптическая биопсия включает в себя ряд методов спектроскопии и визуализации [15,16], позволяющих получать дополнительную диагностическую информацию о различных параметрах морфологии и метаболизма биологических тканей в режиме реального времени *in vivo* [17,18]. В частности, для проведения оптической биопсии во время ТПАБ с использованием игл малого наружного диаметра (14–22 G, или 0.7–2.1 mm) самым распространенным направлением доклинических исследований является разработка тонкоигольных оптических зондов для реализации различных спектроскопических методов диагностики [19–24].

Среди оптических методов диагностики широкое применение для исследования метаболической активности клеток здоровых и патологически измененных тканей (воспаленная, злокачественная и т.д.) в ряде областей медицины нашла флуоресцентная спектроскопия (ФС) [25,26]. Данный метод основан на возбуждении флуоресценции эндогенных или экзогенных флуорофоров в биологической ткани монохроматическим излучением ближнего ультрафиолетового (УФ) или видимого диапазонов и дальнейшей регистрации полученного спектра для анализа и сравнения. В ряде работ флуоресцентная спектроскопия используется как основной диагностический метод или в составе мультимодальных устройств, имеющих тонкоигольные оптоволокон-

ные зонды для диагностики опухолевых образований легких [27,28] и молочных желез [29,30].

Многие формы коферментов никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), содержащиеся в цитозоле и митохондриях клеток, обладают выраженными спектрами эндогенной флуоресценции, изменения в интенсивности которых возможно регистрировать *in vivo*, что лежит в основе исследований метаболической активности тканей [31–34]. Указанные коферменты являются неотъемлемой частью реакций клеточного метаболизма, выступая в качестве доноров и акцепторов электронов для синтеза молекул аденозинтрифосфата (АТФ), обеспечивающих энергией прочие многочисленные биохимические реакции [35]. Оба кофермента претерпевают реакции окисления и восстановления, при этом из всех форм наибольший вклад в формирование спектров флуоресценции тканей вносят восстановленный НАД (НАДН) и окисленный ФАД. Проведенные ранее клинические исследования показали, что изменения интенсивностей флуоресценции НАДН и ФАД в тканях связаны с возникновением патологических процессов в них, в том числе с развитием онкологических процессов [36]. Однако спектр флуоресценции тканей, регистрируемый спектрометром, является следствием сложения сигналов флуоресценции не только НАДН и ФАД, но и других эндогенных флуорофоров, таких как коллаген, эластин, порфирины, липофусцин, билирубин и др. Флуоресценция этих веществ также возбуждается светом с длинами волн, близкими к длинам волн возбуждения окислительно-восстановительных коферментов. По этой причине необходимо учитывать вклад НАДН и ФАД в общий регистрируемый сигнал флуоресценции для правильной интерпретации различий, наблюдаемых между здоровыми и патологически измененными тканями.

Разработка канала ФС для оптической биопсии злокачественных новообразований требует надежных и воспроизводимых измерений спектральных характеристик нормальных и патологических тканей в области исследования. Для дальнейшего внедрения технологии в клиническую практику необходимо проводить исследования, направленные на оценку чувствительности устройств оптической биопсии к изменениям сигнала флуоресценции, отражающим метаболическую активность в митохондриях клеток, а также на разработку методик корректировки регистрируемого спектра для более точной интерпретации данных. Распространенным способом апробации устройств флуоресцентной диагностики в настоящее время является использование специально разрабатываемых тест-объектов (фантомов). Такие фантомы обладают близкими к биологическим тканям оптическими свойствами и изготавливаются для имитации спектральных характеристик, определяемых содержанием различных флуорофоров [37–39]. Другим направлением являются *in vitro* и *in vivo* исследования оценки влияния факторов, способных вызвать изменения метаболической активности в тканях. Одним из

таких факторов является применение широкого спектра митохондриальных ингибиторов и разобщителей, оказывающих воздействие непосредственно на функции митохондрий, что отражается в аномальном увеличении или уменьшении накопления коферментов НАДН и ФАД в ходе биохимических реакций, а следовательно, дает отклик при измерении интенсивности флуоресценции [40–42]. Однако большинство протоколов подобных исследований разработаны и применяются для измерений на клеточных культурах [43–47], единичные работы посвящены исследованиям, адаптирующим данный подход к целым органам модельных животных [32,48].

Таким образом, целью данной работы явилось исследование чувствительности измерительного канала ФС устройства для тонкоигольной оптической биопсии к содержанию основных целевых эндогенных флуорофоров, связанных с клеточным метаболизмом, для того чтобы объективно продемонстрировать способность разработанного устройства оценивать состояние биологических тканей *in situ* и *in vivo*.

Материалы и методы

В ходе постановочного эксперимента исследования проводились на специально разработанном устройстве для проведения оптической биопсии [49], содержащем два измерительных канала — ФС и спектроскопии диффузного отражения (СДО). В канале ФС для возбуждения автофлуоресценции НАДН и ФАД использовалось излучение от светодиода с длиной волны 365 нм и лазерного диода с длиной волны 450 нм [50]. Выходная мощность используемых источников составила не более 1.5 мВт и 3.5 мВт соответственно, что обеспечивает соблюдение требований безопасности по эффективной освещенности тканей [51,52], а также уменьшает эффект фотообесцвечивания коферментов. Для ослабления обратно рассеянного излучения источников использовались светофильтры FGL400 и FGL495 (Thorlabs, Inc., USA) с длинами волн среза 400 нм и 495 нм в соответствии с используемыми источниками. Для регистрации спектров флуоресценции в диапазоне 350–1000 нм использовался малогабаритный ПЗС-спектрометр FLAME-T-VIS-NIR-ES (Ocean Optics, USA).

Канал СДО необходим для компенсации влияния кровенаполнения тканей на сигнал флуоресценции, а также может быть использован для получения дополнительной информации о морфологической структуре тканей. Канал содержит широкополосный вольфрамовый галогенный источник излучения HL-2000-FHSA (Ocean Optics, USA) с диапазоном 360–2400 нм. Управление устройством и обработка получаемых данных осуществлялись с помощью специально разработанного программного обеспечения в программной среде MATLAB.

Доставка излучения от источников и сбор вторичного оптического излучения от биологической ткани осуществляется с помощью специально разработанного

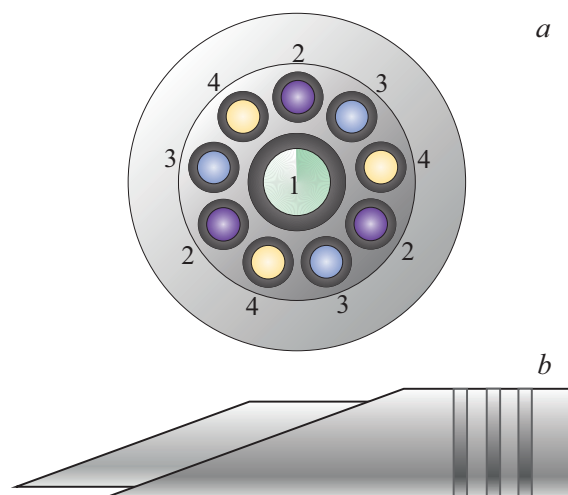


Рис. 1. (а) Схема расположения оптических волокон в тонкоигольном оптическом зонде устройства для проведения оптической биопсии: 1 — волокно к спектрометру, 2 — от источника 365 нм, 3 — от источника 450 нм, 4 — от широкополосного источника. (б) Расположение оптического зонда в стандартной игле 17.5 G.

тонкоигольного оптического зонда с наружным диаметром 1 мм, что позволяет вводить его в исследуемую область через тонкую иглу с наружным диаметром 17.5 G (рис. 1). Внутри зонда расположены 10 оптических волокон: центральное волокно диаметром 200 мкм используется для сбора излучения и его передачи к спектрометру, 9 волокон диаметром 100 мкм (по 3 волокна для каждого источника) служат для равномерного освещения области исследования источниками излучения во время измерений. Торцевое волоконное устройство зонда имеет скос 20° для обеспечения плотного контакта с тканями. Значение числовой апертуры оптических волокон в зонде — 0.22.

Для того чтобы смоделировать быстрые изменения метаболической активности тканей, использовался разобщитель окислительного фосфорилирования (протонофор) карбонилцианид *m*-хлорфенил-гидразон (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone, CCCP). Соединение CCCP является ингибитором окислительного фосфорилирования, повышающим проницаемость митохондриальной мембраны, нарушая тем самым протонный градиент [53]. Нанесение CCCP на поверхность ткани вызывает снижение содержания НАДН в клетках, содержание ФАД наоборот повышается. Нарушение переноса протонов по электронной транспортной цепи приводит к недостаточному синтезу молекул АТФ, что в целом ведёт к постепенному разрушению клеток и гибели организма [54].

Для получения исходного раствора CCCP из концентрата (Sigma-Aldrich, USA) в качестве растворителя был выбран диметилсульфоксид (dimethyl sulfoxide, DMSO) [46]. Это вещество широко распространено в химических исследованиях как сероорганический рас-

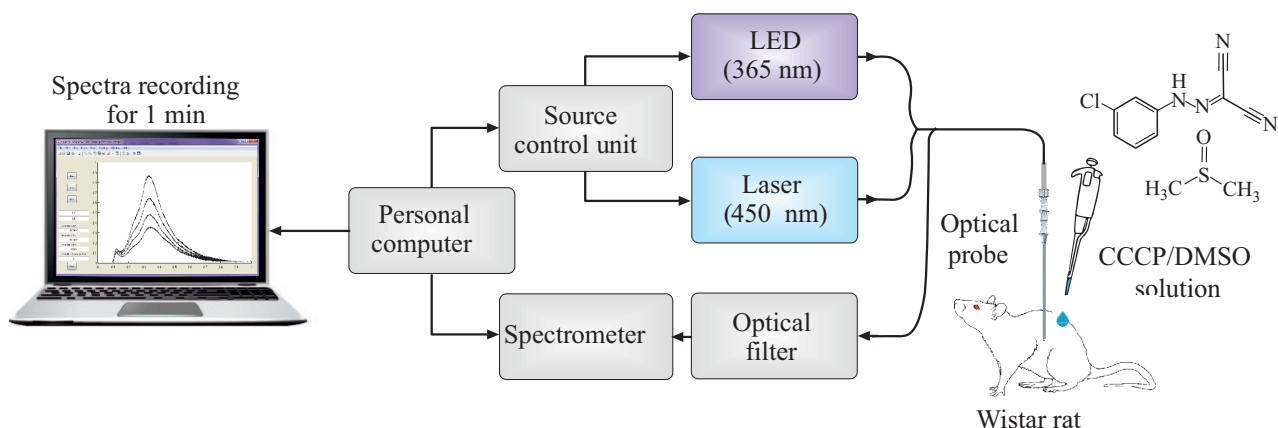


Рис. 2. Схема проведения эксперимента с помощью канала флуоресцентной спектроскопии устройства для проведения тонкоигольной оптической биопсии.

творитель для других веществ. В биофотонике DMSO применяется для оптического просветления биотканей [55], при этом просветляющие свойства DMSO сохраняют спустя длительный промежуток времени после воздействия [56]. Другой особенностью DMSO, важной для данной работы, является способность не только проникать в биологические ткани, но и переносить в них другие химические соединения [57,58], что может быть использовано для более выраженного наблюдения эффекта от использования раствора CCCP.

Для подбора оптимальных значений достоверного сигнала флуоресценции ткани в зависимости от типа самой ткани и характеристик разработанного канала ФС в ходе эксперимента использовались различные концентрации раствора CCCP. Для экспериментальных исследований был использован исходный раствор CCCP в концентрации 1 mM и разбавленные растворы в концентрации 0.1 mM и 0.01 mM, полученные путем разведения в натрий-фосфатном буфере (phosphate buffered saline, PBS). Раствор DMSO использовался для проведения контрольных измерений без разбавителя в исходной концентрации 100% и в концентрациях 10% и 1% после разведения в PBS.

В качестве модельного животного в исследовании использовался клинически здоровый самец крысы линии Wistar (возраст 3 месяца). Крысу анестезировали препаратом Золетил 100 (Vibac, Франция) в стандартной дозе и фиксировали на специальной платформе. На первом этапе эксперимента измерения проводились после нанесения растворов DMSO и CCCP микропипеткой на предварительно подготовленной коже живота. На втором этапе выполнялась лапаротомия с последующим нанесением растворов на поверхности печени, сердца и скелетных мышц задней конечности крысы. Регистрация спектров флуоресценции проводилась с интервалом в 1 с. Схематическое изображение эксперимента приведено на рис. 2.

После регистрации спектров флуоресценции для анализа динамики изменения сигнала во времени выби-

рались максимальные значения интенсивности флуоресценции в диапазонах 480–530 nm (для источника излучения 365 nm) и 500–550 nm (для источника излучения 450 nm). Относительное изменение интенсивности флуоресценции в течение эксперимента оценивалось путем вычисления отношения интенсивности флуоресценции в N -ю секунду эксперимента IF_N к значению интенсивности флуоресценции, зарегистрированному в начале измерений IF_0 . По полученным соотношениям были построены кривые изменения максимальных интенсивностей флуоресценции во времени.

Результаты исследований и их обсуждение

Подбор мощностей источников излучения осуществлялся исходя из мер по снижению влияния фотообесцвечивания. В начале каждого измерения перед нанесением растворов DMSO и CCCP проводилась регистрация спектров флуоресценции при непрерывном освещении ткани для учета наличия данного эффекта. В ряде случаев наблюдалось незначительное фотообесцвечивание тканей, причем в среднем этот эффект был более выражен для источника излучения 450 nm. После данной проверки в случае, если фотообесцвечивание не было выражено, наносились растворы веществ и проводилась регистрация массива спектров. В ходе эксперимента часть сигналов при различных концентрациях веществ, воздействующих на ткани органов, были признаны неудовлетворительными из-за низкого соотношения сигнал-шум и не были учтены при анализе данных.

При анализе динамики изменения максимальной интенсивности флуоресценции в ходе эксперимента с воздействием растворами DMSO (рис. 3,4) было отмечено, что спектры флуоресценции кожи и мышечной ткани показывают удовлетворительную воспроизводимость. При этом флуоресценция мышечной ткани оставалась

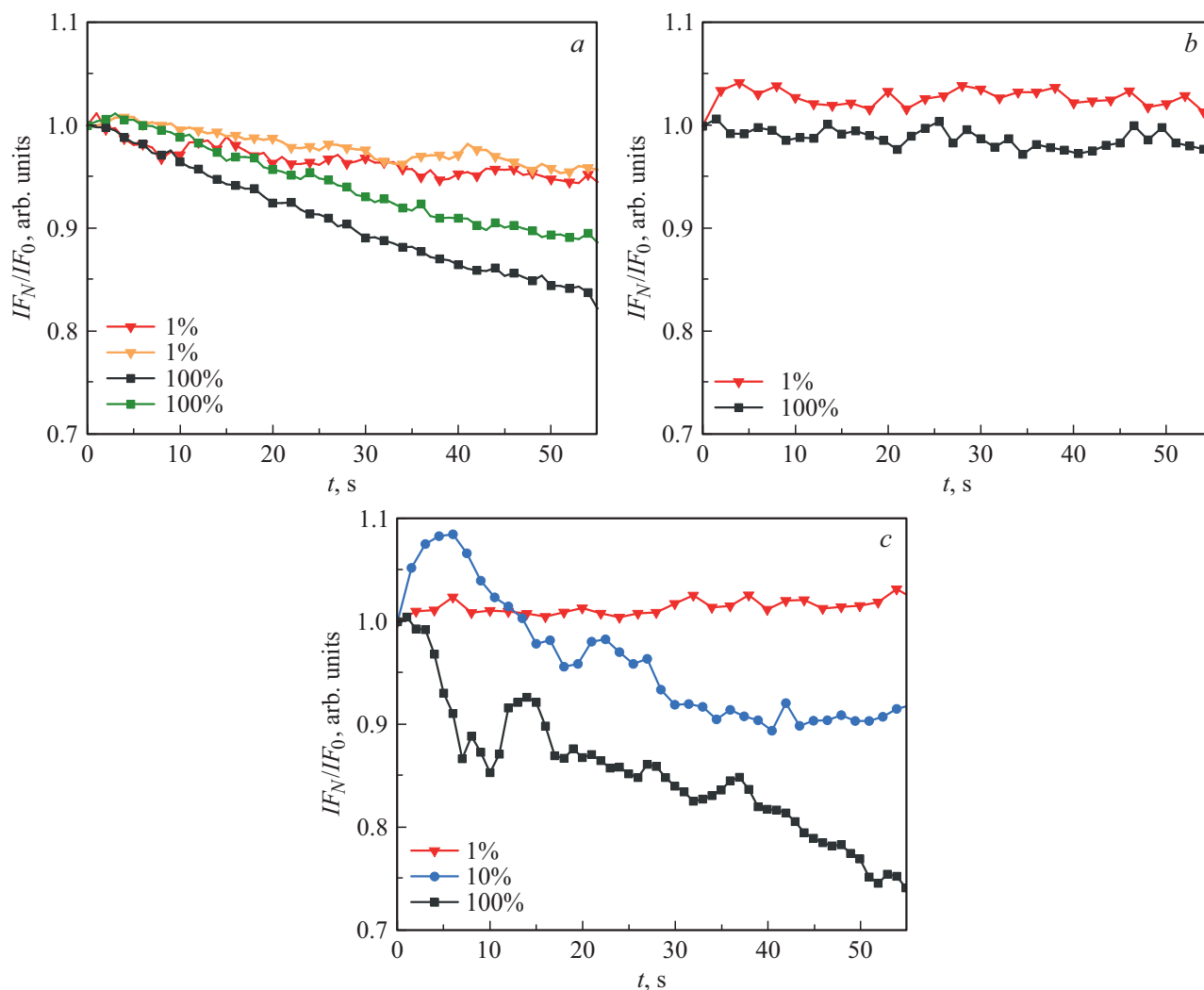


Рис. 3. Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции в диапазонах 480–530 nm для источника излучения 365 nm после применения различных концентраций DMSO. Области исследования: *a* — кожа, *b* — мышца, *c* — печень.

относительно стабильной (падение сигнала не более 10%) под воздействием раствора DMSO с разными концентрациями при возбуждении излучением как 365 nm, так и 450 nm. Падение сигнала на коже составило 10% и более в случае взаимодействия ткани с более высокой (100%) концентрацией DMSO. В случае внутренних органов было отмечено, что интенсивность флуоресценции в тканях печени и сердца снижалась более значительно, в частности, в печени снижение достигло более 25% (при возбуждении излучением 450 nm) даже при малых концентрациях действующего агента. При возбуждении излучением 365 nm падение сигнала было значительным только при воздействии на ткани печени чистым раствором DMSO. Поскольку в эксперименте были предприняты меры для записи данных без влияния фотообесцвечивания, предполагается, что это может быть вызвано токсическим действием DMSO, которое может проявляться изменениями в структуре клеточной мембраны при определенных концентрациях. Так, тради-

ционно считается, что в исследованиях *in vivo* DMSO не оказывает токсического действия при концентрациях вплоть до 10% [59,60], но при более высоких концентрациях данное вещество проявляет свойства ингибитора митохондриального дыхания и приводит к апоптозу клеток [61,62]. Кроме того, в литературе встречаются сведения о механизмах возникновения токсического действия DMSO при использовании концентраций около 2–4% [63].

Как и при измерениях с растворами DMSO, было замечено, что ткани кожи и мышц независимо от концентрации вещества в меньшей степени проявили ожидаемый от СССР эффект в отличие от тканей печени и сердца. Возможно, это связано с тем, что СССР и DMSO имели разнонаправленное действие на флуоресцентный сигнал и частично компенсировали друг друга.

После воздействия на ткани печени раствором СССР с концентрацией 0.1 mM было замечено, что флуоресценция, индуцированная излучением 365 nm, уменьши-

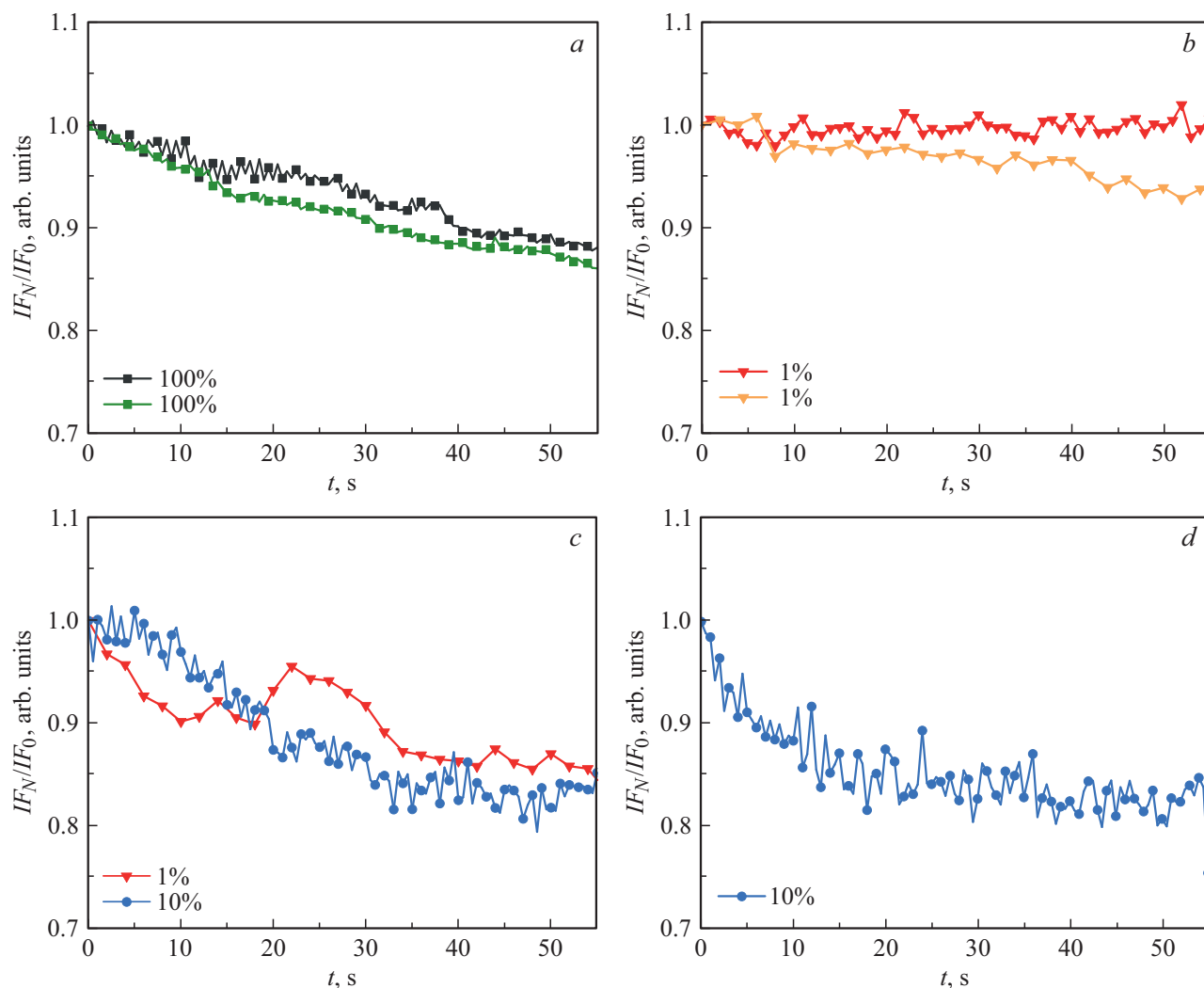


Рис. 4. Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции в диапазонах 500–550 nm для источника излучения 450 nm после применения различных концентраций DMSO. Области исследования: *a* — кожа, *b* — мышца, *c* — печень, *d* — сердце.

лась так же сильно, как при воздействии 100% раствором DMSO (рис. 5, *c*), при этом основной процесс снижения интенсивности флуоресценции пришелся на первые 20 s. Поскольку нарушение окислительного фосфорилирования из-за разобщения протонного перехода приводит к повышенному потреблению электронов, реакции окисления донора электронов НАДН до НАД происходят более активно. Так как НАД не обладает таким же выраженным спектром флуоресценции, как НАДН, снижение содержания восстановленной формы кофермента в клетках становится заметным по характерному снижению максимальной интенсивности флуоресценции во времени [46].

При возбуждении излучением с длиной волны 450 nm в тканях сердца и печени нанесение раствора СССР концентрацией 1 mM вызвало значительное увеличение флуоресценции (рис. 6). Динамика роста сигнала во времени может быть обусловлена тем, что по мере

того, как СССР вызывает повышенную активность митохондрий из-за стимулирования реакций окислительного фосфорилирования и возрастает потребление электронов, все большее количество молекул восстановленной формы ФАДН₂ окисляются до ФАД, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции [64].

Результаты экспериментальных исследований показали, что кожа и скелетные мышцы задней лапы крысы были менее восприимчивы к описанным химическим воздействиям, в то время как внутренние органы (печень, сердце) оказались более чувствительными и подверглись как ожидаемому эффекту разобщения окислительного фосфорилирования при воздействии СССР, так и токсическому эффекту растворителя DMSO. Использование разных концентраций растворов не вызвало различий в скорости и величине изменений интенсивности флуоресценции кожи и мышц, в то время как применение высоких концентраций растворов на тканях печени и

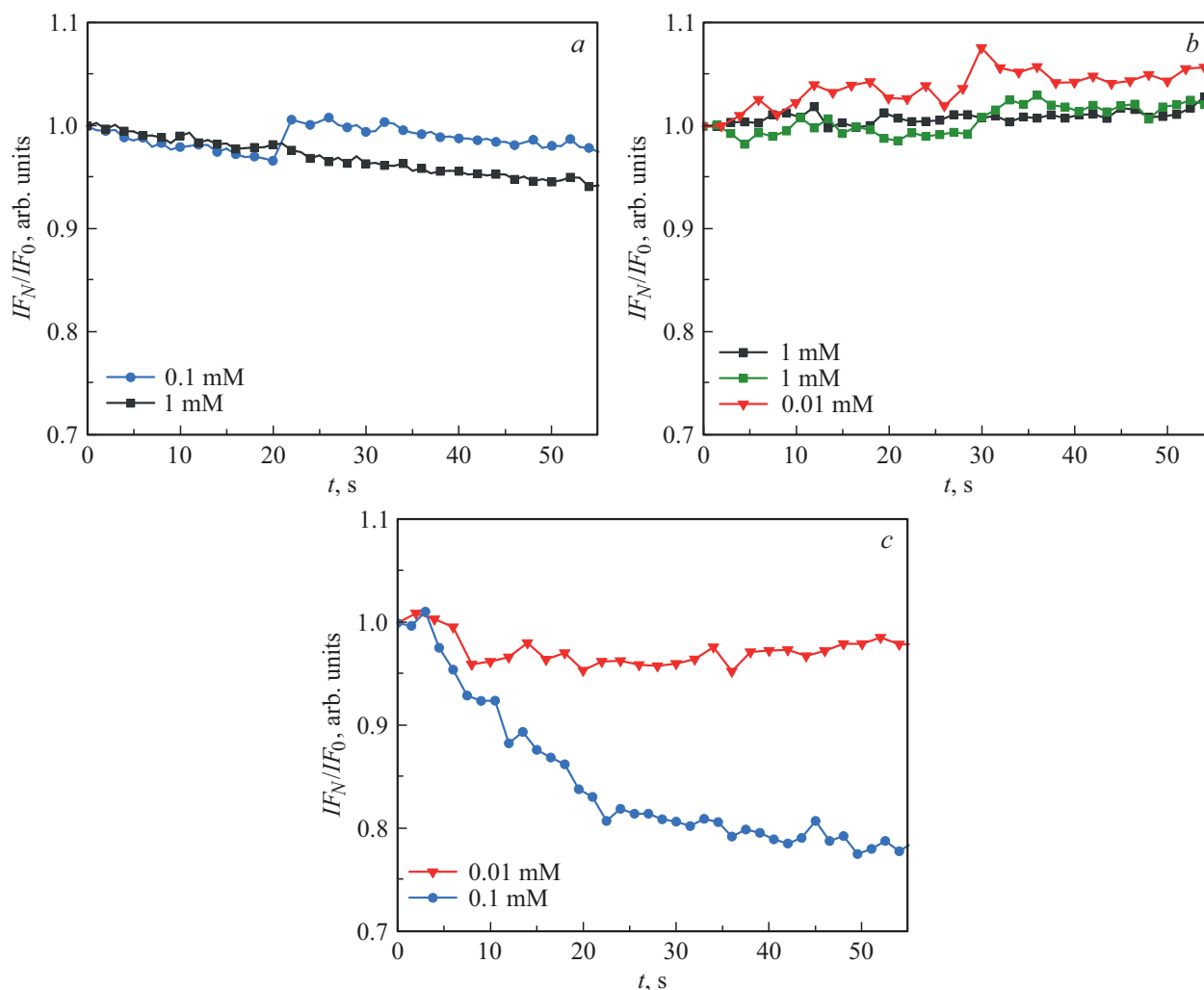


Рис. 5. Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции в диапазонах 480–530 нм для источника излучения 365 нм после применения различных концентраций CCCP. Области исследования: *a* — кожа, *b* — мышца, *c* — печень.

сердца позволило добиться более выраженного и быстрого проявления изменений интенсивности флуоресценции, обусловленных влиянием на метаболическую активность клеток в тканях *in vivo*.

Выводы

Использование широкого числа методов оптической биопсии в настоящее время представляется многообещающим направлением для внедрения в клиническую практику врача-хирурга, так как они позволяют получать дополнительную диагностическую информацию о состоянии метаболизма и морфологической структуре биологических тканей в режиме реального времени, которая может иметь важное значение в процессе лечения онкологических заболеваний. В частности, для обеспечения первичной диагностической оценки новообразований печени уже в процессе проведения ТПАБ одним из перспективных методов представляется ФС, которая может быть внедрена в том числе и в стандартные

биопсийные иглы. В настоящей работе была проверена чувствительность канала ФС устройства, разработанного ранее, для проведения оптической биопсии во время процедуры ТПАБ к метаболическим изменениям в митохондриях клеток *in vivo*. Это крайне важно для оценки процессов канцерогенеза в биологических тканях, в том числе печени, одним из отличительных признаков которого являются метаболические нарушения вследствие активного роста опухоли.

Разработка протоколов и проведение *in vivo* исследований влияния факторов, способных вызвать изменения в процессах окислительного фосфорилирования митохондрий, может лечь в основу более точной интерпретации данных ФС. Полученные в настоящей работе результаты показывают возможность адаптации методологии анализа клеточного метаболизма *in vitro* к проведению подобных измерений *in vivo* в тканях органов. Однако необходимы дальнейшие исследования, направленные на экспериментальный выбор оптимальных концентраций CCCP и DMSO с учетом полученных результатов, в том

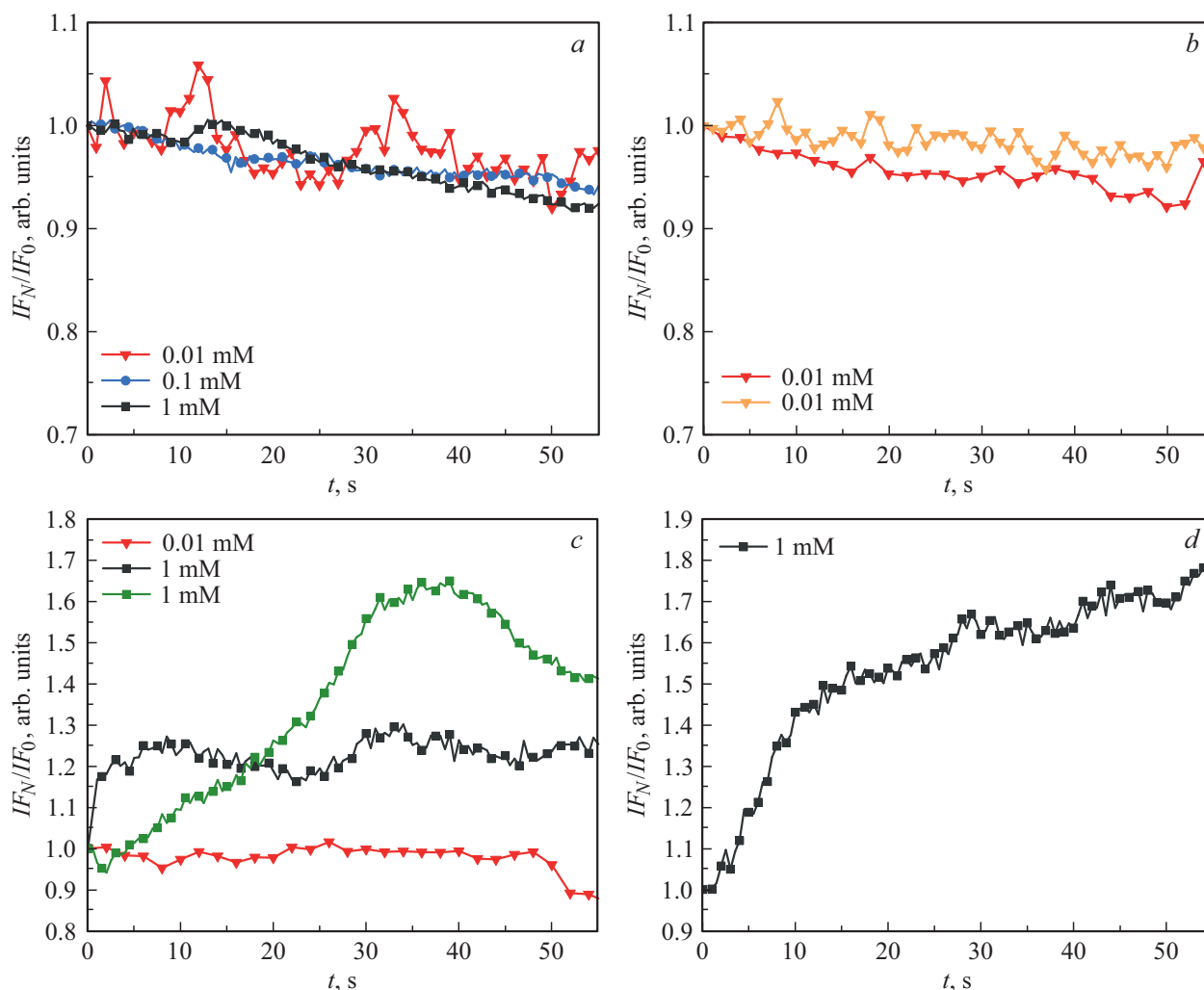


Рис. 6. Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции в диапазонах 500–550 nm для источника излучения 450 nm после применения различных концентраций CCCP. Области исследования: *a* — кожа, *b* — мышца, *c* — печень, *d* — сердце.

числе выводов о токсичности действия DMSO на ткани *in vivo*. Так как результаты, представленные в настоящей работе продемонстрировали более выраженный эффект для спектров флуоресценции, в которые наибольший вклад вносило изменение содержания ФАД, представляет интерес наблюдение подобного эффекта, вызванного изменениям НАДН. Поэтому в дальнейших исследованиях предполагается применять другие митохондриальные ингибиторы и разобщители. Для этих целей возможно использовать ингибитор ротенон, вызывающий блокирование переноса электронов через комплекс I, избыток которых отражается в быстром увеличении содержания НАДН без существенных изменений в содержании ФАД [65].

Полученные в представленной работе результаты показали способность канала ФС устройства оптической биопсии регистрировать изменения флуоресценции, обусловленные метаболическими изменениями в тканях, что подтверждает обоснованность использования устройства для проведения ТПАБ в клинической

практике, в том числе при диагностике новообразований печени.

Финансирование исследования

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-15-00201).

Соблюдение этических стандартов

Исследования проводились в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (GLP), установленными Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), и были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО „Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева“ (протокол заседания № 12 от 6.09.2018).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] The Cancer Atlas, 3rd edition. International Agency for Research on Cancer. 2019. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://canceratlas.cancer.org>
- [2] *Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F.* // Lyon, Fr. Int. agency Res. cancer. 2013.
- [3] Liver cancer fact sheet. Global Cancer Observatory, 2018. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- [4] *Clark T., Maximin S., Meier J., Pokharel S., Bhargava P.* // *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* 2015. V. 44. N 6. P. 479. doi 10.1067/j.cpradiol.2015.04.004
- [5] *Valery P.C., Laversanne M., Clark P.J., Petrick J.L., McGlynn K.A., Bray F.* // *Hepatology.* 2018. V. 67. N 2. P. 600. doi 10.1002/hep.29498
- [6] *Mahvi D.A., Mahvi D.M.* // *Abeloff's Clinical Oncology.* 2020. P. 846.
- [7] *Gharib H., Papini E., Paschke R., Duick D.S., Valcavi R., Hegedüs L., Vitti P.* // *Endocrine Practice.* 2010. V. 16. Suppl. 1. P. 1. doi 10.4158/EP.16.3.468
- [8] *Pitman M.B.* // *Clin. Lab. Med.* 1998. V. 18. N 3. P. 483. doi 10.1016/S0272-2712(18)30160-4
- [9] *Wee A.* // *Patholog. Res. Int.* 2011. V. 2011. 587936. doi 10.4061/2011/587936
- [10] *Chhieng D.C.* // *World J. Surg. Oncol.* 2004. V. 2. N 1. P. 5. doi 10.1186/1477-7819-2-5
- [11] *Choi S.H., Han K.H., Yoon J.H., Moon H.J., Son E.J., Youk J.H., Kim E., Kwak J.Y.* // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2011. V. 74. N 6. P. 776. doi 10.1111/j.1365-2265.2011.04011.x
- [12] *Gomez-Macias G.S., Garza-Guajardo R., Segura-Luna J., Barboza-Quintana O.* // *Cytojournal.* 2009. V. 6. P. 9. doi 10.4103/1742-6413.52831
- [13] *Kalogeraki A., Papadakis G.Z., Tamiolakis D., Karvela-Kalogeraki I., Karvelas-Kalogerakis M., Segredakis J., Moustou E.* // *Rom. J. Intern. Med.* 2015. V. 53. N 3. P. 209. doi 10.1515/rjim-2015-0028
- [14] *Alfano R., Pu Y.* // *Lasers for Medical Applications.* 2013. P. 325.
- [15] *Кандурова К.Ю., Дрёмин В.В., Жеребцов Е.А., Альянов А.Л., Мамошин А.В., Потапова Е.В., Дуняев А.В., Мурадян В.Ф., Сидоров В.В., Крупаткин А.И.* // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018. Т. 17. № 3. С. 71; *Kandurova K.Y., Dremin V.V., Zherebtsov E.A., Alyanov A.L., Mamoshin A.V., Potapova E.V., Dunaev A.V., Muradyan V.F., Sidorov V.V., Krupatkin A.I.* // *Regional Blood Circulation and Microcirculation.* 2018. V. 17. N 3. P. 71. doi 10.24884/1682-6655-2018-17-3-71-79
- [16] *Wang T.D., Van Dam J.* // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2004. V. 2. N 9. P. 744. doi 10.1016/S1542-3565(04)00345-3
- [17] *Тучин В.В.* Оптическая биомедицинская диагностика: в 2-х т. / Учебное издание. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. Т. 1. 559 с.
- [18] *Kennedy G.T., Okusanya O.T., Keating J.J., Heijian D.F., Deshpande C., Litzky L.A., Albelda S.M., Drebin J.A., Nie S., Low P.S., Singhal S.* // *Ann. Surg.* 2015. V. 262. N 4. P. 602. doi 10.1097/SLA.0000000000001452
- [19] *Alchab L., Dupuis G., Balleyguier C., Mathieu M., Fontaine-Aupart M., Farcy R.* // *J. Biophotonics.* 2010. V. 3. N 5–6. P. 373. doi 10.1002/jbio.200900070
- [20] *Mayevsky A., Walden R., Pewzner E., Deutsch A., Heldenberg E., Lavee J., Tager S., Kachel E., Raanani E., Preisman S., Glauber V., Segal E.* // *J. Biomed. Opt.* 2011. V. 16. N 6. P. 067004. doi 10.1117/1.3585674
- [21] *Evers D.J., Nachabe R., Hompes D., Van Coevorden F., Lucassen G.W., Hendriks B.H.W., van Velthuysen M.-L., Wesseling J., Ruers T.J.M.* // *Eur. J. Surg. Oncol.* 2013. V. 39. N 1. P. 68. doi 10.1016/j.ejso.2012.08.005
- [22] *Splithoff J.W., Prevoo W., Meier M.A.J., de Jong J., Klomp H.M., Evers D.J., Sterenborg H.J.C.M., Lucassen G.W., Hendriks B.H.W., Ruers T.J.M.* // *Clin. Cancer Res.* 2016. V. 22. N 2. P. 357. doi 10.1158/1078-0432.CCR-15-0807
- [23] *Tanis E., Evers D.J., Splithoff J.W., Pully V.V., Kuhlmann K., van Coevorden F., Hendriks B.H.W., Sanders J., Prevoo W., Ruers T.J.M.* // *Lasers Surg. Med.* 2016. V. 48. N 9. P. 820. doi 10.1002/lsm.22581
- [24] *Kandurova K., Potapova E., Shupletsov V., Kozlov I., Seryogina E., Dremin V., Zherebtsov E., Alekseyev A., Mamoshin A., Dunaev A.* // *Proc. SPIE.* 2019. V. 11079. P. 110791C. doi 10.1117/12.2526747
- [25] *Croce A.C., Bottiroli G.* // *Eur. J. Histochem.* 2014. V. 58. N 4. P. 320. doi 10.4081/ejh.2014.2461
- [26] *Rafailov I.E., Dremin V.V., Litvinova K.S., Dunaev A.V., Sokolovski S.G., Rafailov E.U.* // *J. Biomed. Opt.* 2016. V. 21. N 2. P. 025006. doi 10.1117/1.JBO.21.2.025006
- [27] *Harris K., Rohrbach D.J., Attwood K., Qiu J., Sunar U.* // *J. Thorac. Dis.* 2017. V. 9. N 5. P. 1386. doi 10.21037/jtd.2017.03.113
- [28] *Braun F., Schalk R., Nachtmann M., Hien A., Frank R., Beuermann T., Methner F.-J., Kränzlin B., Rädle M., Gretz N.* // *Meas. Sci. Technol.* V. 30. N 10. P. 104001. doi 10.1088/1361-6501/ab24a1
- [29] *Mathieu M.-C., Toullec A., Benoit C., Berry R., Validire P., Beaumel P., Vincent Y., Maroun P., Vielh P., Alchab L.* // *Eur. Radiol.* 2018. V. 28. N 6. P. 2507. doi 10.1007/s00330-017-5228-7
- [30] *Splithoff J.W., Evers D.J., Jaspers J.E., Hendriks B.H.W., Rottenberg S., Ruers T.J.M.* // *Transl. Oncol.* 2014. V. 7. N 2. doi 10.1016/j.tranon.2014.02.009
- [31] *Vo-Dinh T.* *Biomedical Photonics Handbook: Biomedical Diagnostics.* CRC Press, 2014. 889 p.
- [32] *Mayevsky A., Rogatsky G.G.* // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2007. V. 292. N 2. P. C615. doi 10.1152/ajpcell.00249.2006
- [33] *Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M.* // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2014. V. 11. N 3. P. 400. doi 10.1016/j.pdpdt.2014.05.003
- [34] *Луккина М.М., Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В.* // *Современные технологии в медицине.* 2016. Т. 8. N 4. С. 113; *Lukina M.M., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V.* // *Sovremennyye Tehnologii v Medicine.* 2016. V. 8. N 4. P. 113. doi 10.17691/stm2016.8.4.16
- [35] *Heikal A.A.* // *Biomark. Med.* 2010. V. 4. N 2. P. 241. doi 10.2217/bmm.10.1
- [36] *Koenig K., Schneckenburger H.* // *J. Fluoresc.* 1994. V. 4. P. 17–40. doi 10.1007/BF01876650
- [37] *Wang D., Chen Y., Liu J.T.C.* // *Biomed. Opt. Express.* 2012. V. 3. N 12. P. 3153. doi 10.1364/BOE.3.003153
- [38] *Логинава Д.А., Сергеева Е.А., Крайнов А.Д., Агрба П.Д., Кириллин М.Ю.* // *Квант. электрон.* 2016. Т. 46. № 6. С. 528; *Loginova D.A., Sergeeva E.A., Krainov A.D., Agrba P.D., Kirillin M.Y.* // *Quantum Electron.* 2016. V. 46. N 6. P. 528. doi 10.1070/QEL16133

- [39] *Потапова Е.В., Дрёмин В.В., Жеребцов Е.А., Подмастерьев К.В., Дунаев А.В.* // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. 2018. Т. 331. № 5. С. 105. doi 10.1002/1873-3468.12964
- [41] *Foster K.A., Beaver C.J., Turner D.A.* // *Neuroscience*. 2005. V. 132. N 3. P. 645. doi 10.1016/j.neuroscience.2005.01.040
- [42] *Zherebtsov E., Angelova P., Sokolovski S., Abramov A., Rafailov E.* // *Proc. SPIE*. 2018. V. 10685. P. 106854E. doi 10.1117/12.2307552
- [43] *Kim Y.J., Mizushima S., Tokuda H.* // *J. Biochem*. 1991. V. 109. N 4. P. 616. doi 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123429
- [44] *Takahashi E., Endoh H., Ishikawa M., Kishi M., Doi K.* // *Oxygen Transport to Tissue XXIV*. 2003. P. 565. doi 10.1007/978-1-4615-0075-9_54
- [45] *Drozdowicz-Tomsia K., Anwer A.G., Cahill M.A., Madlum K.N., Maki A.M., Baker M.S., Goldys E.M.* // *J. Biomed. Opt.* 2014. V. 19. N 8. P. 86016. doi 10.1117/1.JBO.19.8.086016
- [46] *Bartolomé F., Abramov A.Y.* // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1264. P. 263. doi 10.1007/978-1-4939-2257-4_23
- [47] *Weissig V., Edeas M.* *Mitochondrial Medicine*. V. 1. Humana Press, 2015. 480 p. doi 10.1007/978-1-4939-2257-4
- [48] *Mottin S., Laporte P., Cespuglio R.* // *Neurochem*. 2003. V. 84. N 4. P. 633. doi 10.1046/j.1471-4159.2003.01508.x
- [49] *Dremin V., Potapova E., Zherebtsov E., Kozlov I., Seryogina E., Kandurova K., Alekseyev A., Piavchenko G., Kuznetsov S., Mamoshin A., Dunaev A.* // *Proc. SPIE*. 2019. V. 108770. P. 108770K. doi 10.1117/12.2509255
- [50] *Lakowicz J.R.* *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013. 698 p.
- [51] The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection // *Health Phys.* 2004. V. 87. N 2. P. 171. doi 10.1097/00004032-200408000-00006
- [52] *Dremin V.V., Zherebtsov E.A., Sidorov V.V., Krupatkin A.I., Makovik I.N., Zherebtsova A.I., Zharkikh E.V., Potapova E.V., Dunaev A.V., Doronin A.A., Bykov A.V., Rafailov I.E., Litvinova K.S., Sokolovski S.G., Rafailov E.U.* // *J. Biomed. Opt.* 2017. V. 22. N 8. P. 085003. doi 10.1117/1.JBO.22.8.085003.
- [53] *Плакунов В., Николаев Ю.* *Основы динамической биохимии*. Логос, 2017. 216 с.
- [54] *Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L.* // *Bio-protocol*. 2019. V. 9. N 1. P. e3128. doi 10.21769/BioProtoc.3128
- [55] *Vargas G., Chan K.F., Thomsen S.L., Welch A.J.* // *Lasers Surg. Med.* 2001. V. 29. N 3. P. 213. doi 10.1002/lsm.1110
- [56] *Bui A.K., McClure R.A., Chang J., Stoianovici C., Hirshburg J., Yeh A.T., Choi B.* // *Lasers Surg. Med.* 2009. V. 41. N 2. P. 142. doi 10.1002/lsm.20742
- [57] *Capriotti K., Capriotti J.A.* // *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2012. V. 5. N 9. P. 24.
- [58] *Marren K.* // *Phys. Sportsmed.* 2011. V. 39. N 3. P. 75. doi 10.3810/psm.2011.09.1923
- [59] *Pelzel H.R., Schlamp C.L., Waclawski M., Shaw M.K., Nickells R.W.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012. V. 53. N 3. P. 1428. doi 10.1167/iovs.11-8872
- [60] *Rojas J.C., Saavedra J.A., Gonzalez-Lima F.* // *Brain Res.* 2008. V. 1215. P. 208. doi 10.1016/j.brainres.2008.04.001
- [61] *Hanslick J.L., Lau K., Noguchi K.K., Olney J.W., Zorumski C.F., Mennerick S., Farber N.B.* // *Neurobiol. Dis.* 2009. V. 34. N 1. P. 1. doi 10.1016/j.nbd.2008.11.006
- [62] *Yu Z.W., Quinn P.J.* // *Biosci. Rep.* 1994. V. 14. N 6. P. 259. doi 10.1007/BF01199051
- [63] *Galvao J., Davis B., Tilley M., Normando E., Duchon M.R., Cordeiro M.F.* // *FASEB J.* 2014. V. 28. N 3. P. 1317. doi 10.1096/fj.13-235440
- [64] *Kirkpatrick N.D., Zou C., Brewer M.A., Brands W.R., Drezek R.A., Utzinger U.* // *Photochem. Photobiol.* 2005. V. 81. N 1. P. 125.
- [65] *Danylovyh H.V.* // *Ukr. Biochem. J.* 2016. V. 88. N 1. P. 31. doi 10.15407/ubj88.01.031