

04

Голографическое исследование отклика клеток линии HeLa на фотодинамическое воздействие с эндогенно генерируемым протопорфирином IX

© А.А. Жихорева¹, А.В. Белашов¹, А.А. Ахундзянов², Е.В. Беглова³, Д.А. Горбенко⁴, И.К. Литвинов⁵,
А.В. Салова⁵, Т.Н. Беляева⁵, Е.С. Корнилова⁵, И.В. Семенова¹, О.С. Васютинский¹

¹ ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Московский физико-технический институт,
141701 Москва, Россия

³ СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова,
194021 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: anna_zhikhoreva@mail.ru

Поступила в редакцию 19.08.2021 г.

В окончательной редакции 19.08.2021 г.

Принята к публикации 26.08.2021 г.

С помощью цифровой голографической микроскопии исследованы изменения морфологических и оптических параметров клеток линии HeLa, предварительно инкубированных с 5-аминолевулиновой кислотой (5-ALA), после фотодинамического воздействия (ФДВ) при вариации интенсивности возбуждающего излучения. Проведена оптимизация алгоритма сегментации клеток на их фазовом изображении. Разработанный алгоритм позволил в автоматическом режиме получать данные по большой выборке (более 600) клеток в образце. Определены морфологические и оптические параметры клеток при разных дозах ФДВ и показано логнормальное распределение среднего фазового набегу клеток. Зарегистрированы изменения клеточных параметров при разных дозах облучения, инициирующих программируемую клеточную смерть и гибель клеток путем некроза.

Ключевые слова: голографическая микроскопия, клеточная смерть, фотодинамическая терапия, PpIX, 5-ALA.

DOI: 10.21883/OS.2022.02.51996.2660-21

Введение

Цифровая голографическая микроскопия широко применяется в настоящее время для исследования клеточных культур и их реакции на внешние воздействия [1,2]. Ее преимущества перед фазово-контрастной и широкопольной оптической микроскопией заключаются в возможности получения численных значений морфологических и оптических параметров клеток при использовании малой плотности облучения, что делает этот метод исследования практически неинвазивным. С помощью голографической микроскопии проводились исследования динамики морфологии клеток крови [2–5], эндотелиальных клеток [6], нейронов [7,8], культур раковых клеток [9–11] и их отклика на противоопухолевую терапию [12–16], бактериальной инфекции клеток [17]. Была показана возможность определения не только морфологических и оптических параметров клеток, но и их сухой массы [18], метастатического потенциала [19] и типа клеточной гибели при внешнем воздействии [20]. Также была показана перспективность использования

голографической микроскопии для исследования гистологических срезов тканей [21–23].

Несмотря на возможность полной автоматизации эксперимента в цитологических исследованиях методом голографической микроскопии, количество анализируемых клеток в образце обычно не превышает 30–50, что связано с трудностями автоматического определения границ клеток на фазовых изображениях при наличии когерентного шума. Ранее нами был разработан алгоритм сегментации клеток, основанный на морфологическом анализе изображения, а именно на реконструкции фазового изображения клеток овалом, размер которого задавался исходя из средних размеров клеток конкретной клеточной линии [24]. Однако в ходе применения этой методики был обнаружен ряд недостатков, связанных с некорректной сегментацией клеток при возможном изменении их морфологии и исследовании клеточных линий разных размеров. Кроме того, процедура морфологического анализа изображения, лежащего в основе ранее описанного алгоритма, занимает большое количество времени и компьютерной памяти. В насто-

ящей работе представлен оптимизированный алгоритм сегментации клеток, в основе которого лежат простые операции, сокращающие время работы программы и автоматического нахождения параметров сегментации, что позволяет увеличить количество анализируемых клеток в образце, а также исследовать клеточные линии, различающиеся по размерам.

Одним из существенных преимуществ голографической микроскопии при исследовании живых клеток является предельно малая плотность мощности лазерного излучения, используемого для регистрации фазовых изображений клеток. Это позволяет проводить длительный неинвазивный мониторинг состояния клеток в течение нескольких часов. Более того, проведение такого голографического исследования возможно даже для фотосенсибилизированных клеток (предварительно инкубированных в растворе фотосенсибилизатора), если используемая длина волны излучения находится вне полосы поглощения фотосенсибилизатора.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) все более широко используется для лечения онкологических заболеваний разных типов и локализаций [25–27], а также для инактивации бактериальных [28], вирусных [29] и грибковых [30] инфекций. Принцип действия ФДТ основан на генерации активных форм кислорода в клетках и тканях с помощью молекул фотосенсибилизаторов. Одним из перспективных фотосенсибилизаторов для целей ФДТ и диагностики является эндогенно генерируемый протопорфирин IX (PpIX), который в нормальных условиях жизнедеятельности образуется в митохондриях клеток из эндогенной 5-аминолевулиновой кислоты (5-ALA) и является прекурсором миоглобина, цитохрома и гема [31]. Как известно, добавление в клетки 5-ALA приводит к увеличению образования PpIX, который используется для генерации активных форм кислорода в ходе ФДТ. При этом известно [32], что 5-ALA более интенсивно накапливается в опухолевой ткани, что приводит к более активной генерации PpIX и обеспечивает возможность проведения эффективной ФДТ этих тканей.

Настоящая работа посвящена применению цифровой голографической микроскопии и разработанного алгоритма сегментации клеток для сравнительного анализа изменений морфологических и оптических параметров клеток линии HeLa, вызванных фотодинамическим воздействием (ФДВ) с эндогенно образованным PpIX. Разработана программа автоматической сегментации клеток на восстановленных фазовых изображениях, что позволило впервые провести голографическое исследование параметров более 600 клеток в образце. Определен набор клеточных параметров: сухая масса и ее плотность, средний фазовый набег, площадь проекции, фазовый объем до и после ФДВ с разными дозами.

1. Материалы и методы

1.1. Проведение ФДВ и изготовление клеточных образцов

В работе исследовались образцы клеток постоянной клеточной линии карциномы шейки матки человека HeLa (коллекция клеток института Цитологии РАН, Санкт-Петербург) до и после ФДВ с PpIX при разных дозах облучения. Клетки культивировались в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина при постоянной температуре 37°C, 50% влажности и 5%-ном содержании CO₂ в атмосфере. При достижении 70% монослоя клеток в питательную среду добавляли 5-ALA (препарат Аласенс) в концентрации 100 µg/ml. Как было показано нами ранее [33], наибольшее накопление PpIX в клетках при такой концентрации 5-ALA в культуральной среде достигается после инкубации в течение 3–4 h. После 4-часовой инкубации с 5-ALA клетки промывались фосфатным буфером PBS и облучались лазером на длине волны 405 nm в течение 5 min при разной плотности мощности излучения в диапазоне от 3 до 50 mW/cm². Через 2 h после ФДВ клетки фиксировались 3% раствором формалина (Sigma, США) и исследовались с помощью цифрового голографического микроскопа. Для проведения сравнительного анализа аналогичным образом приготавливались образцы без ФДВ.

1.2. Исследование образцов голографическим методом

Для анализа образцов использовался лабораторный цифровой голографический микроскоп, собранный по схеме интерферометра Маха-Цендера. Для регистрации голограмм использовался HeNe-лазер, излучающий на длине волны 633 nm, плотность мощности излучения на образце составляла 50 µW/cm². Запись интерференционных картин производилась с помощью CMOS-камеры MD-USB121GM-T (MDvision Technology) с размером пикселя 3.75 µm. Как нами было показано ранее, используемая плотность мощности регистрирующего излучения не оказывает влияния на жизнеспособность клеток [20]. Для получения большой выборки данных, необходимой для корректного статистического анализа, проводились сканирование и регистрация более 200 интерференционных картин по всей площади образца. Фазовые изображения восстанавливались с использованием стандартного алгоритма с использованием метода наименьших квадратов [20,34]. Сегментация клеток на фазовых изображениях и вычисление их параметров проводились в автоматическом режиме с помощью описанного ниже оптимизированного алгоритма.

1.3. Алгоритм сегментации клеток на фазовых изображениях

Разработанный оптимизированный алгоритм автоматической сегментации клеток состоит из такого же набора основных шагов, что и алгоритм, предложенный нами ранее [24]. Однако в предлагаемой версии алгоритма отличаются способы реализации этих шагов, что позволило существенно сократить время и компьютерную память при обработке фазовых изображений клеток.

Алгоритм работает следующим образом.

(I) На первом этапе работы ликвидируется наклон фона фазового изображения и проводится его нормировка. Для выделения областей фона проводится анализ гистограммы распределения фазового набега, индуцированного в каждой точке образца. Фазовый набег фона восстановленного исходного изображения варьируется в широком диапазоне (рис. 1, *a*) из-за влияния случайных слабо взаимосвязанных источников шума: вибраций, неоднородностей предметного и покровного стекол, распределения по образцу фиксирующего вещества, когерентного шума и темнового тока на матрице камеры. В предположении нормального распределения значений фазового набега, индуцированного областями без клеток, фон определяется как совокупность пикселей, в которых изменение фазы прошедшего волнового фронта меньше среднеквадратичного отклонения (рис. 1, *b*). Аппроксимация выделенных пикселей плоскостью позволяет компенсировать наклон, а среднее значение распределения позволяет нормировать фазовое изображение. Такой подход в несколько итераций позволяет хорошо компенсировать наклон, нормировать изображение и определить диапазон значений фазового набега фона (рис. 1, *a, c*).

(II) На втором этапе алгоритма проводится поиск центров клеток. Вне диапазона значений фона выделяются замкнутые области, в которые попадают как отдельные клетки, так и их группы (рис. 1, *d*). Для точного разграничения смежных клеток внутри каждой такой замкнутой области (рис. 1, *e*) производится построение статистического распределения фазового набега, после чего определяется пороговое значение φ_{tr} , отсекающее 1/3 части пикселей с наибольшим фазовым набегом в гистограмме (рис. 1, *f*). После этого центры клеток определяются как замкнутые области с фазовым набегом $\varphi > \varphi_{tr}$ (рис. 1, *g*). Для найденных областей центров клеток (рис. 1, *h*) рассчитываются геометрические центры и их площади S .

(III) Далее проводится расширение найденных центров клеток (рис. 1, *i* слева) за счет присоединения пикселей, которые не входят в диапазон фона. Для точного определения границ смежных клеток был введен относительный коэффициент ξ , позволяющий однозначно присвоить каждую точку изображения к определенному на предыдущем этапе центру клетки:

$$\xi = (r_c / \sqrt{S}).$$

Пиксель присоединяется к тому центру, для которого расстояние до геометрического центра клетки r_c , разделенное на квадратный корень из площади этого центра S , наименьшее.

Выбранный критерий ξ практически не влияет на результат сегментации двух смежных клеток с близкими морфологическими параметрами, но позволяет повысить качество сегментации при анализе клеток в разных состояниях, что особенно актуально при исследовании клеток в процессе их гибели. Как видно из рис. 1, *i*, при использовании абсолютного критерия, основанного на минимизации расстояния до центра клетки (при отсутствии деления на корень из площади центра S), разграничение клеток (отмеченное белой штриховой линией) происходит в области внутри клетки большего размера, что приводит к ложному результату. Окончательно сформированные маски смежных клеток, полученные при использовании относительного критерия ξ , показаны цветом на рис. 1, *i* справа.

(IV) С помощью сформированных сегментов фазового изображения, соответствующих клеткам, рассчитываются оптические и морфологические параметры клеток, такие как площадь проекции, сухая масса, средний по площади фазовый набег, фазовый объем, площадь поверхности и индекс сферичности фазового профиля [35].

Предложенный алгоритм адаптивно находит как диапазон фона, так и параметры, необходимые для нахождения границ между клетками, что является существенным преимуществом для автоматизации исследования клеток разных линий с различающимися морфологическими параметрами. Сведение сегментации клеток к простым действиям позволило существенно сократить время обработки регистрируемых изображений. Разработанный алгоритм сегментации был использован в настоящей работе для анализа параметров более чем 600 клеток в каждом из исследуемых образцов.

2. Полученные результаты

В работе были исследованы изменения морфологических и оптических характеристик клеток линии HeLa, предварительно инкубированных с 5-ALA, при ФДВ с разными дозами облучения. Вначале были проведены измерения морфологических и оптических параметров клеток (I) контрольного образца — без добавления 5-ALA и без облучения на длине волны 405 nm. Кроме того, для оценки влияния на клеточные параметры инкубации клеток в растворе 5-ALA и используемого для ФДВ излучения исследовались образцы (II) с добавлением 5-ALA и без облучения и (III) без добавления 5-ALA при облучении на длине волны 405 nm с высокой плотностью мощности 75 mW/cm² в течение 5 min. Затем были проведены измерения на образцах, подвергнутых ФДВ с разными дозами облучения: с плотностью мощности от 3 до 50 mW/cm² в течение 5 min.

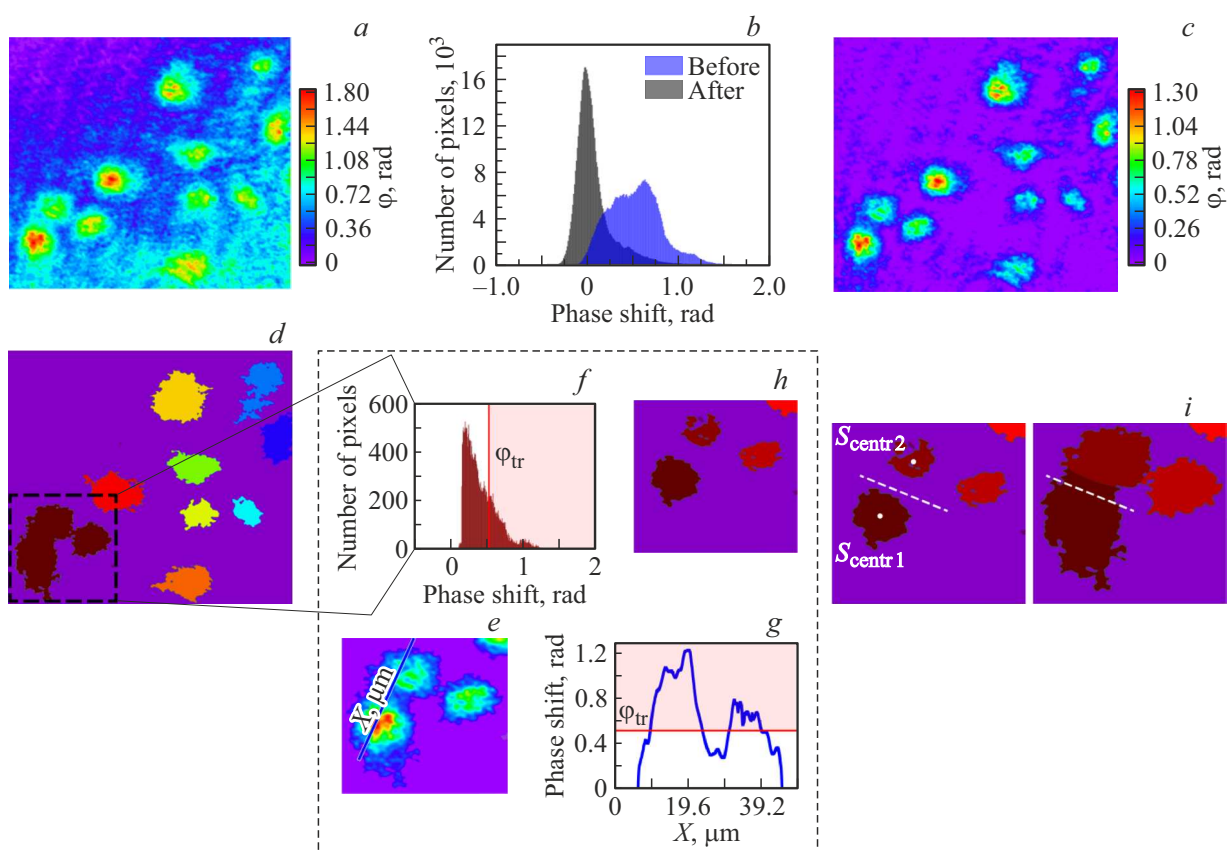


Рис. 1. Пример действия алгоритма сегментации. *a* — исходное фазовое изображение группы клеток, *b* — гистограммы распределения фазового набега до и после устранения наклона фона, *c* — фазовое изображение после устранения наклона фона, *d* — замкнутые области, в которых фазовый набег находится вне диапазона значений фона, *e* — фазовое изображение смежных клеток при наложении маски, отсекающей области фона, *f* — гистограмма фазового набега изображения *e*, *g* — поперечное сечение вдоль синей линии, изображенной на рисунке *e*, *h* — замкнутые области, в которых фазовый набег выше φ_{tr} , *i* — результат расширения центров клеток при использовании относительного критерия ξ (результатирующие маски обозначены цветом). Белой штриховой линией обозначена граница при отсутствии деления на корень из площади центра *S*.

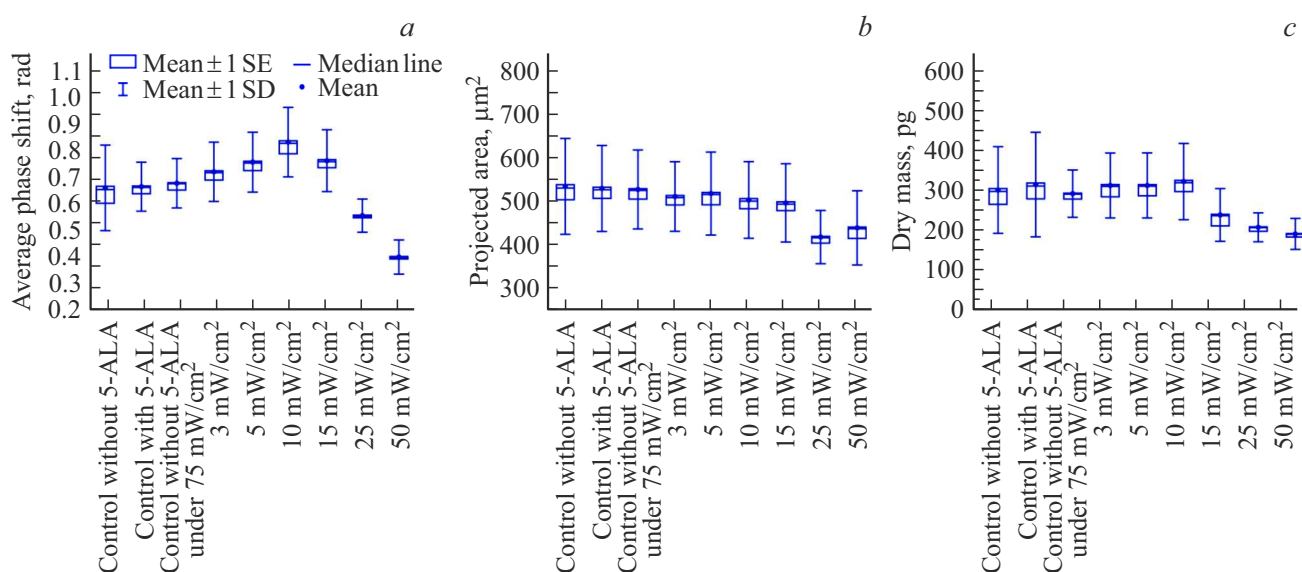


Рис. 2. Результаты измерений (*a*) среднего фазового набега, (*b*) площади проекции, (*c*) сухой массы клеток в контрольных образцах и образцах, подвергнутых ФДВ с 5-ALA с разными дозами облучения.

На рис. 2 представлены результаты измерения среднего фазового набега, площади проекции и сухой массы клеток, полученных из анализа 600–1000 клеток в каждом образце. Из полученных данных видно, что введение в клетки 5-ALA без их облучения и облучение клеток без 5-ALA на длине волны 405 nm с высокой плотностью мощности излучения не приводят к статистически значимым изменениям параметров клеток по сравнению с контрольным образцом без 5-ALA и без облучения. Таким образом, можно утверждать, что полученные изменения морфологических и оптических параметров клеток вызваны именно ФДВ с эндогенно образованным РrIX.

Клетки, подвергшиеся ФДВ, демонстрируют разный отклик в зависимости от дозы облучения. Как видно из рис. 2, при малых дозах облучения (3–10 мВт/см²) происходит увеличение среднего фазового набега и отсутствуют статистически значимые изменения сухой массы клеток. Как было показано нами ранее [20], такие изменения характерны для гибели клеток путем апоптоза, который сопровождается округлением и дегидратацией клетки при сохранении целостности ее мембраны. Однако подобные изменения могут происходить при других программируемых механизмах гибели клетки, поэтому однозначное определение механизма гибели при малых дозах требует дополнительного исследования с помощью биологических тестов. Разные значения увеличения среднего фазового набега относительно контрольного образца указывают на разную степень повреждения клеток при различных дозах ФДВ на момент их исследования.

При высоких дозах облучения (25 и 50 мВт/см²) наблюдается статистически значимое уменьшение среднего фазового набега, площади проекции и сухой массы клеток по сравнению с контрольными образцами. Как было показано в работах [16,20], такие изменения морфологических и оптических параметров клеток характерны для гибели клеток путем некроза, в ходе которого происходит разрыв мембраны и вытекание внутриклеточной среды наружу. При этом повышение плотности мощности облучения с 25 до 50 мВт/см² не приводит к статистически значимому изменению сухой массы в отличие от среднего фазового набега. Такая зависимость этих двух параметров от дозы ФДВ может быть связана с разной степенью повреждения мембраны и скоростью вытекания внутриклеточной среды наружу, что соответственно приводит к разным значениям среднего фазового набега на момент фиксации клеток. Отсутствие изменения сухой массы при увеличении плотности мощности с 25 до 50 мВт/см² может указывать на то, что повреждение мембраны в обоих случаях было настолько сильным, что большинство внутриклеточных структур оказались за пределами клеток, а различие среднего фазового набега при 25 и 50 мВт/см², скорее всего, связано с разным остаточным содержанием воды в клетках.

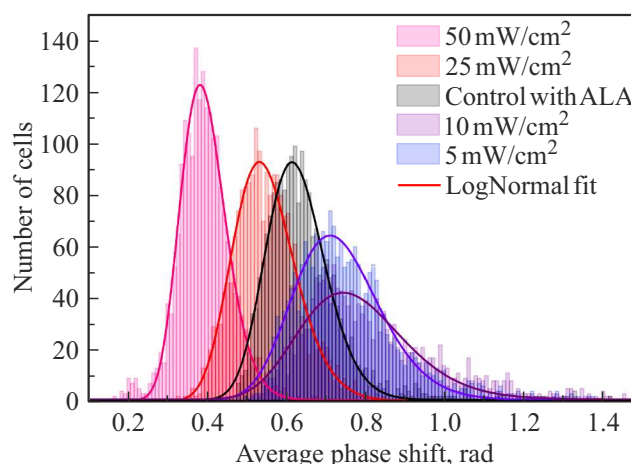


Рис. 3. Гистограммы распределения среднего фазового набега по выборкам клеток в образцах без ФДВ и при разных дозах облучения. Огибающие соответствуют логнормальному распределению.

Отклик клеток на ФДВ при облучении с плотностью мощности 15 мВт/см² сопровождается увеличением среднего фазового набега относительно клеток контрольных образцов, но при этом наблюдается уменьшение их сухой массы, что может свидетельствовать об одновременном протекании разных механизмов гибели клеток в культуре, часть клеток может погибнуть апоптозоподобным путем, а часть — путем некроза.

Кроме того, при ФДВ происходит не только изменение средних значений измеряемых параметров, а также изменяется вид распределения параметров. На рис. 3 приведены гистограммы распределения среднего фазового набега в клетках исследуемых образцов. Как видно из рисунка, при больших дозах облучения распределение среднего фазового набега более симметрично, чем при малых дозах или без облучения. Это может быть связано с отсутствием синхронизации по жизненному циклу в культуре, что приводит к существенному разбросу клеточных параметров в контрольных образцах и при малых дозах ФДВ. Интересно отметить, что в результате ФДВ изменяются не только характеристики клеток, но и степень их разброса (среднеквадратичного отклонения) в исследованных выборках, что выражается в сужении или уширении соответствующих распределений. На наш взгляд, это может свидетельствовать о том, что при некротических изменениях, не сопряженных с активными внутриклеточными процессами, нивелируется разница, связанная с фазой клеточного цикла, при которой был инициирован процесс некроза. Однако вариация параметров клеток в случае программируемой клеточной гибели повышается из-за зависимости от фазы жизненного цикла и индивидуальных особенностей клеток, что приводит к разному времени их отклика на ФДВ и разной скорости протекания внутриклеточных процессов.

Отметим, что распределение клеточных параметров по популяции клеток HeLa близко к логнормальному, как это наблюдалось другими авторами при анализе других клеточных параметров с использованием разных методов исследования [36–38].

Заключение

В настоящей работе проведена оптимизация алгоритма автоматической сегментации клеток на их фазовом изображении, полученном методом голографической микроскопии. Оптимизированный алгоритм позволил получать данные по большой выборке (более 600) клеток в образце и продемонстрировать логнормальные распределения клеточных параметров. Проведено исследование изменений морфологических и оптических параметров клеток после ФДВ с эндогенно образованным протопорфирином IX с разными дозами облучения. При высоких дозах облучения (плотность мощности 25 и 50 мВт/см², облучение в течение 5 мин) зарегистрированы изменения, характерные для гибели клеток путем некроза. Наблюдалось увеличение абсолютных значений изменений среднего фазового набега и площади проекции клеток при повышении плотности мощности с 25 до 50 мВт/см², что хорошо согласуется с данными о разных изменениях клеток в ходе некроза при различных дозах ФДВ [20]. Изменения, наблюдаемые при малых дозах облучения (3–10 мВт/см², облучение в течение 5 мин), схожи с изменениями, характерными для программируемой клеточной гибели, также протекающей с разной степенью выраженности в зависимости от дозы облучения [20].

Показано, что исследование фиксированных образцов клеток методом голографической микроскопии в комбинации с оптимизированным алгоритмом сегментации клеток позволяет получить надежные данные о морфологических и оптических параметрах клеток, основанных на анализе большой выборки клеток в образце. Полученные результаты и предложенный алгоритм сегментации клеток могут быть использованы для дальнейшего развития цифровой голографической микроскопии для автоматизированного цитологического скрининга.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-72-10044).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] Y.K. Park, C. Depeursinge, G. Popescu. *Nature Photonics*, **12** (10), 578–589 (2018). DOI: 10.1038/s41598-019-55330-4

- [2] K. Lee, K. Kim, J. Jung, J. Heo, S. Cho. *Sensors*, **13** (4), 4170–4191 (2013). DOI: 10.3390/s130404170
- [3] G. Popescu, Y. Park, W. Choi, R.R. Dasari, M.S. Feld, K. Badizadegan. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **41** (1), 10–16 (2008). DOI: 10.1016/j.bcmd.2008.01.010
- [4] H.V. Pham, B. Bhaduri, K. Tangella, C. Best-Popescu, G. Popescu. In: *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging* (Optical Society of America, 2013), paper DM4A.4. DOI: 10.1364/DH.2013.DM4A.4
- [5] Y. Park, T. Yamauchi, W. Choi, R. Dasari, M.S. Feld. *Optics Lett.*, **34**, 3668–3670 (2009). DOI: 10.1364/OL.34.003668
- [6] K.W. Seo, E. Seo, S.J. Lee. *J. Visualization*, **17** (3), 235–244 (2014). DOI: 10.1007/s12650-014-0200-y
- [7] S.A. Yang, J. Yoon, K. Kim, Y. Park. *Cytometry A*, **91**, 510–518 (2017). DOI: 10.1002/cyto.a.23110
- [8] P. Marquet, B. Rappaz, P.J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb. *Optics Lett.*, **30** (5), 468–470 (2005). DOI: 10.1364/OL.30.000468
- [9] B. Kemper, D.D. Carl, J. Schnekenburger, I. Bredebusch, M. Schäfer, W. Domschke. *J. Biomedical Optics*, **11** (3), 034005 (2006). DOI: 10.1117/1.2204609
- [10] V.L. Calin, M. Mihailescu, E.I. Scarlat, A.V. Baluta, D. Calin, E. Kovacs. *FEBS Open Bio.*, **7** (10), 1527–1538 (2017). DOI: 10.1002/2211-5463.12282
- [11] Z. El-Schich, A. Leida Mölder, A. Gjørloff Wingren. *Applied Sciences.*, **8** (7), 1027 (2018). DOI: 10.3390/app8071027
- [12] L.V. Croft, J.A. Mulders, D.J. Richard, K. O’Byrne. *Methods in Molecular Biology*, **2054**, 171–183 (2019). DOI: 10.1007/978-1-4939-9769-5_12
- [13] R. Cao, W. Xiao, X. Yi, F. Pan, T. Yao, X. Li. *Quantitative Phase Imaging*, **10887**, 088721 (2019). DOI: 10.1117/12.2510821
- [14] A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, V.G. Bespalov, A.L. Semenov, I.V. Semenova. *Biomedical Optics Express*, **9** (11), 5817–5827 (2018). DOI: 10.1364/BOE.9.005817
- [15] A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, A.B. Danilova, N.A. Avdonkina, I.A. Baldueva, M.L. Gelfond. *J. Photochemistry & Photobiology B: Biology*, **221**, 112235 (2021). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112235
- [16] O. Tolde, A. Gandalovičová, A. Křížová, P. Veselý, R. Chmelík, D. Rosel, J. Brá bek. *Scientific Reports*, **8** (1), 1–13 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-30408-7
- [17] A.E. Ekpenyong, S.M. Man, S. Achouri, C.E. Bryant, J. Guck, K.J. Chalut. *J. Biophotonics*, **6** (5), 393–397 (2013). DOI: 10.1002/jbio.201200113
- [18] B. Rappaz, E. Cano, T. Colomb, J. Kuhn, C.D. Depeursinge, V. Simanis. *J. Biomedical Optics*, **14** (3), 034049 (2009). DOI: 10.1117/1.3147385
- [19] V.L. Calin, M. Mihailescu, E.I. Scarlat, A.V. Baluta, D. Calin, E. Kovacs. *FEBS Open Bio*, **7** (10), 1527–1538 (2017). DOI: 10.1002/2211-5463.12282
- [20] A.V. Belashov, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, N.N. Nikolsky, I.V. Semenova, E.S. Kornilova, O.S. Vasyutinskii. *Biomedical Optics Express*, **10** (10), 4975–4986 (2019). DOI: 10.1364/BOE.10.004975
- [21] H. Majeed, S. Sridharan, M. Mir, L. Ma, E. Min, W. Jung, G. Popescu. *J. Biophotonics*, **10** (2), 177–205 (2017). DOI: 10.1002/jbio.201600113
- [22] Y.K. Park, C. Depeursinge, G. Popescu. *Nature Photonics*, **12** (10), 578–589 (2018). DOI: 10.1038/s41566-018-0253-x
- [23] A.B. Белашов, А.А. Жихорева. *Письма в ЖТФ*, **47** (9), 18 (2021). DOI: 10.21883/PJTF.2021.09.50901.18641

- [24] А.В. Белашов, Д.А. Горбенко, А.А. Жихорева, Т.Н. Беляева, Е.С. Корнилова, И.В. Семенова, О.С. Васютинский. Письма в ЖТФ, **45** (22), 24–27 (2019). DOI: 10.21883/PJTF.2019.22.48644.17980 [A.V. Belashov, D.A. Gorbenko, A.A. Zhikhoreva, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. Technical Physics Lett. **45** (11), 1140–1143 (2019). DOI: 10.1134/S1063785019110191].
- [25] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop. Biomedicine & Pharmacotherapy, **109**, 1098–1107 (2018). DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049
- [26] B. Brown Stanley, E.A. Brown, I. Walker. The Lancet Oncology, **5** (8), 497–508 (2004). DOI: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3
- [27] R.-M. Szeimies, M. Landthaler. *Cancers of the Skin. Proceedings of the 8th World Congress* (2002), p. 240–245. DOI: 10.1007/978-3-642-59410-6_28
- [28] Q. Jia, Q. Song, P. Li, W. Huang. Advanced Healthcare Materials, **8** (14), 1900608 (2019). DOI: 10.1002/adhm.201900608
- [29] P.C. Conrado, K.M. Sakita, G.S. Arita, C.B. Galinari, R.S. Gonçalves, L.D. Lopes. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, **34**, 102221 (2021). DOI: 10.1016/j.pdpdt.2021.102221
- [30] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, M.M. Tunney. Microbiological Research, **163** (1), 1–12 (2008). DOI: 10.1016/j.micres.2007.08.001
- [31] M. Wachowska, A. Muchowicz, M. Firczuk, M. Gabrysiak, M. Winiarska, M. Wańczyk. Molecules, **16** (5), 4140–4164 (2011). DOI: 10.3390/molecules16054140
- [32] K. Mahmoudi, K.L. Garvey, A. Bouras, G. Cramer, H. Stepp, J.J. Raj. J. Neuro-oncology, **141** (3), 595–607 (2019). DOI: 10.1007/s11060-019-03103-4
- [33] Д.А. Горбенко, А.В. Белашов, Т.Н. Беляева, Е.С. Корнилова, И.К. Литвинов, И.В. Семенова, О.С. Васютинский. ЖТФ, **91** (1), 152 (2021). DOI: 10.21883/JTF.2021.01.50288.147-20 [D.A. Gorbenko, A.V. Belashov, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, I.K. Litvinov, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. Technical Physics, **66** (1), 145–148 (2021). DOI: 10.1134/S1063784221010084].
- [34] M. Liebling, T. Blu, M. Unser. JOSA A, **21** (3), 367–377 (2004). DOI: 10.1364/JOSAA.21.000367
- [35] P. Girshovitz, N.T. Shaked. Biomedical Optics Express, **3** (8), 1757–1773 (2012). DOI: 10.1364/BOE.3.001757
- [36] E. Limpert, W.A. Stahel. PloS one, **6** (7), e21403 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0021403
- [37] E. Limpert, W.A. Stahel, M. Abbt. BioScience, **51** (5), 341–352 (2001). DOI: 10.1641/0006-3568(2001)051[0341:LNDATS]2.0.CO;2
- [38] R. Kula, M. Bébarová, P. Matejovič, J. Šimurda, M. Pásek. Progress in Biophysics and Molecular Biology, **157**, 11–17 (2020). DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2020.05.008