

## Исследование морфофункциональных свойств биотканей (*in vivo*) при воздействии низкотемпературной плазменной струи атмосферного давления

© К.М. Гираев<sup>1,2</sup>, Н.А. Ашурбеков<sup>1</sup>, Э.Х. Исрапов<sup>1,2</sup>, Г.Ш. Шахсинов<sup>1</sup>, В.Р. Абдулаев<sup>1</sup>, К.М. Рабаданов<sup>1</sup>, З.М. Исаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Дагестанский государственный университет, 367000 Махачкала, Республика Дагестан, Россия

<sup>2</sup> Институт физики им. Х.И. Амирханова ДФИЦ РАН, 367030 Махачкала, Республика Дагестан, Россия

e-mail: kamal\_giraev@mail.ru, nashurb@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2021 г.

В окончательной редакции 02.02.2022 г.

Принята к публикации 02.02.2022 г.

Приведены результаты спектрально-флуоресцентных и диффузно-оптических исследований биотканей при воздействии низкотемпературной плазменной струи атмосферного давления в смеси воздуха с аргонном. Выявлены потенциальные флуорофоры и определены коэффициенты оптического поглощения и транспортного рассеяния биотканей. Обнаружено, что зондирование биотканей холодной плазмой приводит к росту интенсивности флуоресценции и коэффициента диффузного отражения, что связано с двукратным увеличением коэффициента транспортного рассеяния и изменением концентрации эндогенных хромофоров — снижением содержания воды, липидов и билирубина до 20%, а также ростом показателя насыщения кислородом до 10%. На основе проведенного анализа показано, что терапевтическое действие низкотемпературной плазмы может быть связано с усилением антиоксидантной защиты и развитием процессов компенсаторной дегидратации.

**Ключевые слова:** биоткани, холодная плазма, зондирование, спектроскопия, флуоресценция, диффузное отражение, оптические коэффициенты, светорассеяние, биохимия, морфология.

DOI: 10.21883/OS.2022.05.52439.2697-21

### 1. Введение

Одним из перспективных и быстро развивающихся в последнее время направлений лучевой медицины является плазменная медицина, демонстрирующая высокую терапевтическую эффективность в дерматологии, косметологии, стоматологии и др. (например, [1–4]). В то же время качественный характер результатов исследований и отсутствие детальной информации о физико- и химико-биологических процессах взаимодействия низкотемпературной плазмы с тканями внутренних органов обуславливают высокую актуальность данной научной проблематики.

Физико-химические особенности взаимодействия плазменного излучения с биообъектами имеют уникальную природу, как вследствие сложного состава и механизмов элементарных процессов в плазме, так и многообразия структуры биотканей и клеток. К известным факторам такого воздействия можно отнести электромагнитные поля и УФ излучение, заряженные частицы, кислородосодержащие ( $O$ ,  $O_2^-$ ,  $O_3$ ,  $H_2O_2$ ) и азотосодержащие радикалы ( $N$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$ ,  $N_2O_5$ ) [5–9].

Вышеупомянутое приводит не только к селективному влиянию плазмы на биообъекты различного уровня метаболизма (от бактерицидного эффекта до стимуляции

сложных биохимических реакций), но и к синергетическому эффекту. В комплексе эти эффекты составляют основу лечения таких патологий, как эрозивные и язвенные поражения, вирусные и микотические инфекции и др. [1–12]. Однако несмотря на высокую перспективность плазменной терапии, ряд вопросов все еще остаются открытыми. В частности, необходимо более глубокое понимание биохимических механизмов избирательного воздействия низкотемпературной плазмы как на атипичные ткани, содержащие злокачественные клетки, так и на прилежащие нормальные биоткани.

Важную информацию о структуре, физиологическом и биохимическом состоянии биообъекта способен предоставить метод комбинированной лазерно индуцированной флуоресцентной (ЛИФ) спектроскопии и диффузной рефлектометрии. Данный подход основан на последовательном измерении и анализе спектров флуоресценции и коэффициента диффузного отражения и является малоинвазивным, технически простым и информативным методом прижизненной диагностики множества патологий, в том числе процессов малигнизации [13–20]. Применение данного метода к задачам развития плазменной терапии позволило бы выявить динамику количественных характеристик физико- и химико-биологических процессов и тем самым оценить степень

и систему мониторинга эффективности воздействия низкотемпературной плазмы на биообъекты *in situ*.

Целью работы является исследование динамики структурно-морфологических, физиологических и биохимических свойств биотканей *in vivo* при воздействии низкотемпературной плазменной струи атмосферного давления с использованием методов оптической спектрометрии. При этом были решены следующие задачи:

— измерены спектры ЛИФ и определены потенциальные группы эндогенных флуорофоров;

— измерены спектры коэффициента диффузного отражения и определены коэффициенты поглощения и транспортного рассеяния для интактных и облученных биотканей в диапазоне длин волн 250–1500 nm.

По результатам спектральных исследований выявлены важнейшие физико- и биохимические параметры и обсуждаются возможные механизмы взаимодействия низкотемпературной плазмы с биологическими объектами.

## 2. Материалы и методы

### Материалы исследования

Спектрально-оптические исследования биотканей при воздействии низкотемпературной плазменной струи атмосферного давления проводились на тканях печени *in vivo* 20 половозрелых самцов белых крыс породы Wistar примерно равного возраста и веса (250±30 g). За сутки до начала эксперимента крысы взвешивались и выдерживались сутки без воды и питания для сохранения общего биохимического фона организма. Непосредственно перед проведением экспериментальных исследований крысам, находящимся под общей анестезией, проводилось вскрытие брюшной полости и бережное выведение долей печени в рану. В целях минимизации нарушений, вносимых физиологическими факторами (дыхание биообъекта, мышечные спазмы и др.) в проведение эксперимента, исследуемый орган неподвижно фиксировался на столике-подставке, расположенном поверх тела крысы.

Все применимые международные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

### Схема эксперимента

Общая схема проведения эксперимента заключалась в измерении спектров флуоресценции  $F(\lambda)$  и диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  тканей печени *in vivo* до и после плазменного зондирования. При этом обработке и исследованиям подвергались строго единые участки печеночной ткани, размер которых фиксировался путем наложения на биоткань маски с окном диаметром примерно 5.0 mm.

Плазменное облучение биотканей осуществлялось путем их сканирования плазменным излучением в течение примерно 5–7 min. При этом образцы располагались перпендикулярно факелу на расстоянии 3.0 cm от торца

плазменного волновода, а поток газа был зафиксирован на значении в 0.32 l/min, при котором плазменный факел достигал наибольшей длины. Предварительные измерения показали, что температура плазменной струи не поднималась выше 2° относительно комнатной, что, в свою очередь, позволило исключить термическое воздействие на биообъекты.

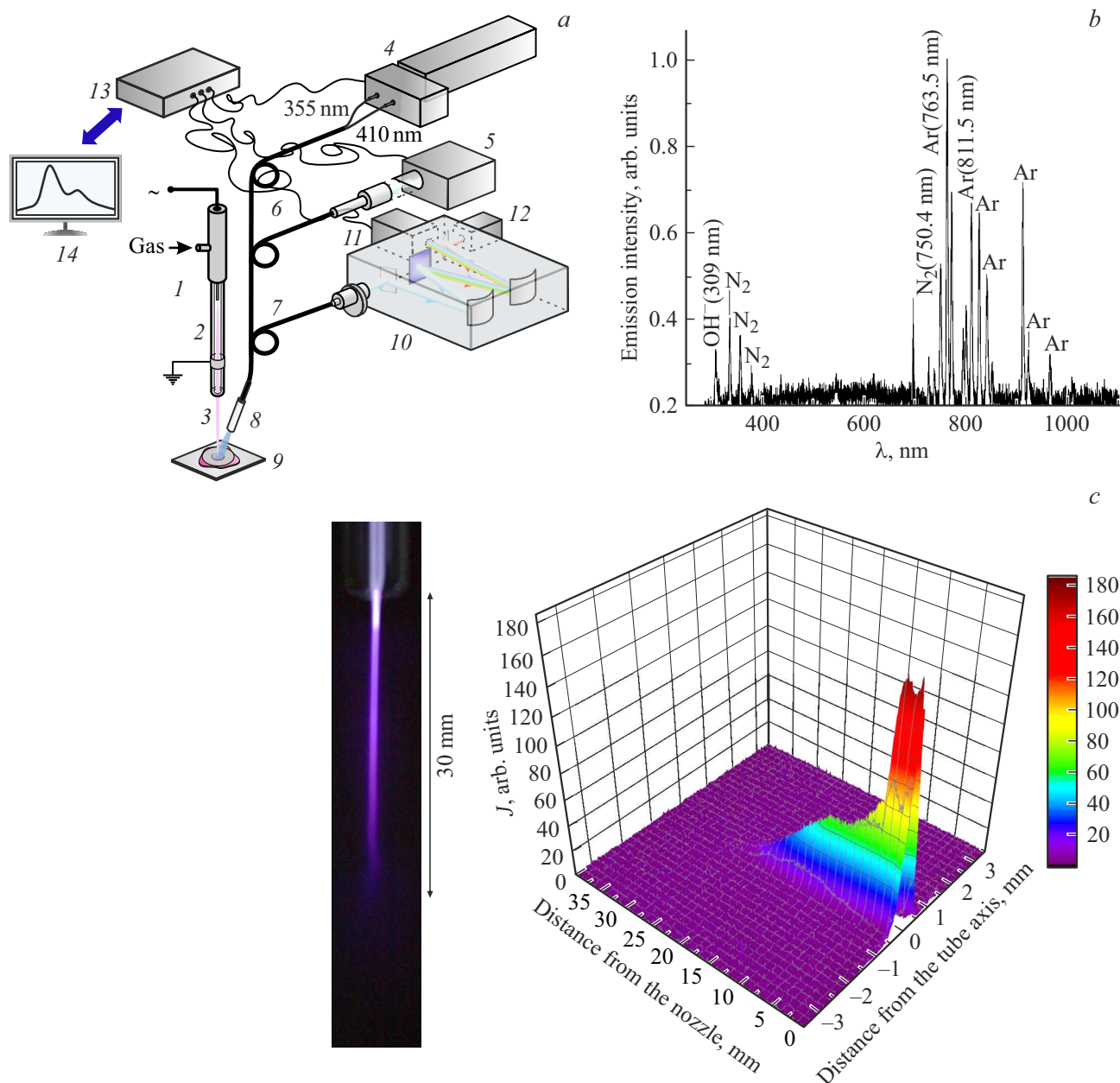
Для каждого образца биотканей было проведено по 3 серии спектральных измерений  $F(\lambda)$  и  $R_d(\lambda)$ . Окончательный результат по исследуемым образцам определялся путем усреднения серийных измерений по среднеквадратичному отклонению  $\delta = \sqrt{\sum_{i=1}^n ((\xi - \xi_i)^2 / n(n-1))}$ , где  $n$  — число серий измерений,  $\xi_i$  — спектры флуоресценции и коэффициента диффузного отражения для  $i$ -й серии,  $\xi$  — среднее значение интенсивности флуоресценции и отражения для биотканей в каждой спектральной точке, определяемое как  $\sum_{i=1}^n \xi_i / n$ . Таким образом, каждые из представленных в работе спектральных данных  $F(\lambda)$  и  $R_d(\lambda)$  есть усредненное значение статистического материала, отобранного и систематизированного для интактных и облученных биотканей.

### Источник плазменного излучения

Для создания источника низкотемпературного плазменного излучения использовался барьерный разряд в цилиндрическом плазменном волноводе, через разрядный промежуток которого пропускается аргон в присутствии воздуха атмосферного давления. Источник плазмы (рис. 1, а) представлял собой электродную систему (1) по типу игла–кольцо, при которой вольфрамовый провод (диаметр 0.5 mm) помещался внутрь кварцевой трубки (2) (внутренний диаметр 1.0 mm, внешний 7.0 mm) и использовался как высоковольтный электрод. На расстоянии 60 mm от него на кварцевую трубку было одето заземленное медное кольцо шириной 10 mm. В качестве рабочего газа использовалась смесь чистого аргона (99.999%), а расход газа контролировался при помощи расходомера GE50A (MKS Instruments, США).

Для формирования плазменной струи (3) использовался высоковольтный наносекундный генератор трансформаторного типа, работающий в частотно-периодическом режиме с частотой повторения аперидических импульсов напряжения 10–100 Hz. Амплитуда положительной полуволны импульса напряжения регулировалась в диапазоне 8–12 kV при времени нарастания импульса  $\sim 50$  ns. При этом ток разряда контролировался при помощи трансформатора тока Model 4100 (Pearson electronics, США), а электрические сигналы регистрировались посредством осциллографа TDS2024B (Tektronix, США).

Спектральные характеристики излучения низкотемпературной плазмы, а также изображение самого плазменного факела и его трехмерная проекция показаны соответственно на рис. 1, b и c.



**Рис. 1.** (а) Блок-схема экспериментальной установки: 1 — источник низкотемпературного плазменного излучения, 2 — кварцевая трубка с электродной системой игла–кольцо, 3 — плазменный факел, 4 — оптический параметрический генератор в комплекте с лазером накачки, 5 — дейтериевая/галогенная лампа, 6 — передающие „рукава“ волоконно-оптического зонда, 7 — принимающий „рукав“, 8 — контактный катетер зонда, 9 — образец биоткани, 10 — монохроматор/спектрограф, 11 — ПЗС-матричная камера, 12 — инфракрасный фотодетектор, 13 — контроллер, 14 — компьютер. (б) Спектральные характеристики излучения низкотемпературной плазмы. (в) Изображение плазменного факела и его трехмерная проекция.

### Спектрально-оптические измерения

Измерение спектров флуоресценции  $F(\lambda)$  и коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  проводилось на лазерно-спектрометрическом комплексе стандартной схемы с использованием волоконно-оптической системы (рис. 1, а). Возбуждение спектров флуоресценции осуществлялось излучением оптического параметрического генератора LP603 в комплекте с лазером накачкой

LQ529 (4) (Солар ЛС, Белоруссия) на длинах волн 355 и 410 nm, а спектров коэффициента диффузного отражения — излучением дейтериевой/галогенной лампы AvaLight-DH-S-BAL (5) (Avantes, Нидерланды).

В качестве волоконно-оптической системы использовался Y-образный измерительный зонд, состоящий из двух „рукавов“ (передающего (6) и принимающего (7)) и контактного катетера (8), в котором коаксиально размещались световодные каналы (диаметр волокон

200  $\mu\text{m}$ , числовая апертура 0.22). Волоконные световоды, формирующие центральный канал зонда (7 волокон — для возбуждения спектров  $R_d(\lambda)$  и 12 — для  $F(\lambda)$ ), предназначались для подведения возбуждающего излучения к биоткани (9), а световоды, расположенные по периферии (72 волокна) образовывали канал регистрации и служили для сбора ответных фотосигналов и передачи их к спектрографу. При этом области возбуждения сигналов  $R_d(\lambda)$  и  $F(\lambda)$  совпадали и имели диаметр примерно  $2.0 \pm 0.5 \text{ mm}$ , а участок регистрации равномерно перекрывал область возбуждения и был примерно в 2 раза больше пятна возбуждения.

Спектральный анализ фотосигналов осуществлялся в спектральном интервале 250–1500 nm при помощи автоматизированного двухканального монохроматора/спектрометра MS3504i (10) (SOL-Instruments, Белоруссия), сопряженного с ПЗС-камерой HS-101(HR)-2048  $\times$  122 (11) (Hamamatsu, Япония) и инфракрасным детектором IGADAT-010TE (12) (SOL-Instruments). При измерениях спектров флуоресценции использовались широкополосные запирающие светофильтры со светопропусканием более 70% в спектральном диапазоне 390–800 nm и 450–1000 nm, а нормировка спектров диффузного отражения осуществлялась при помощи референсного отражателя WS-2 (Avantes, Нидерланды).

### Методика определения оптических свойств

Для определения спектральной зависимости коэффициентов оптического поглощения  $\mu_a(\lambda)$  и транспортного рассеяния  $\mu'_s(\lambda)$  исследуемых биотканей в работе использовался инверсный метод Монте-Карло (ИММК) в приближении полубесконечной среды на основе спектральных данных коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$ . Алгоритм используемого метода вкратце представляет собой последовательную реализацию следующих шагов.

1. Вычисление начальных приближений параметров  $\mu_a(\lambda)$  и  $\mu'_s(\lambda)$  на основе экспериментальных данных  $R_d^{\text{Exp}}(\lambda)$ , используя соотношение [21–23]:

$$R_d^{\text{Exp}}(\lambda) = \exp \left\{ K \left[ 3 \left( 1 + \frac{\mu'_s(\lambda)}{\mu_a(\lambda)} \right) \right]^{-\frac{1}{2}} \right\}, \quad (1)$$

$$\mu_a(\lambda) = \mu_a^{\text{chrom}}(\lambda) + \mu_a^{\text{tissue}}(\lambda), \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \mu_a^{\text{chrom}}(\lambda) = & V_B \alpha \mu_a^{\text{HbO}}(\lambda) + V_B (1 - \alpha) \mu_a^{\text{Hb}}(\lambda) \\ & + V_W \mu_a^{\text{W}}(\lambda) + V_{\text{Br}} \mu_a^{\text{Br}}(\lambda) + V_L \mu_a^{\text{L}}(\lambda), \end{aligned} \quad (3)$$

где  $\mu_a(\lambda)$  и  $\mu'_s(\lambda)$  — соответственно спектры коэффициентов поглощения и транспортного рассеяния для биотканей *in vivo*;  $K$  — постоянная, зависящая от показателя преломления биоткани;  $\lambda$  — длина волны;  $\mu_a^{\text{chrom}}(\lambda)$  и  $\mu_a^{\text{tissue}}(\lambda)$  — спектры коэффициентов поглощения хромофоров и биоткани *in vitro*;  $\mu_a^{\text{HbO}}$ ,  $\mu_a^{\text{Hb}}(\lambda)$ ,  $\mu_a^{\text{W}}(\lambda)$ ,  $\mu_a^{\text{Br}}(\lambda)$  и  $\mu_a^{\text{L}}(\lambda)$  — спектры коэффициента поглощения

соответственно для оксигемоглобина, дезоксигемоглобина, воды, билирубина и липидов [21,24];  $\alpha$  — степень оксигенации крови на исследуемом участке биоткани;  $V_B$ ,  $V_W$ ,  $V_{\text{Br}}$  и  $V_L$  — параметры, характеризующие объемную долю соответственно крови, воды, билирубина и липидов в биотканях.

Спектральная зависимость показателя  $\mu'_s(\lambda)$  может быть с хорошей точностью аппроксимирована двухстепенной функции типа [21–23]:

$$\mu'_s(\lambda) = A_M^{-B_M} + A_R \lambda^{-B_R}, \quad (4)$$

где  $A_M$  и  $A_R$  — безразмерные параметры, являющиеся функциями концентрации рассеивающих частиц (соответственно Ми и Релея), формирующие общий уровень коэффициента  $\mu'_s$ , тогда как волновые экспоненты  $B_M$  и  $B_R \rightarrow 4$  характеризуют средний размер рассеивающих частиц и определяют угол наклона спектров коэффициента  $\mu'_s$ .

2. Вычисление расчетных параметров коэффициента диффузного отражения  $R_d^{\text{Calc}}(\lambda)$  по значениям начальных приближений коэффициентов  $\mu_a(\lambda)$  и  $\mu'_s(\lambda)$ , используя метод Монте-Карло.

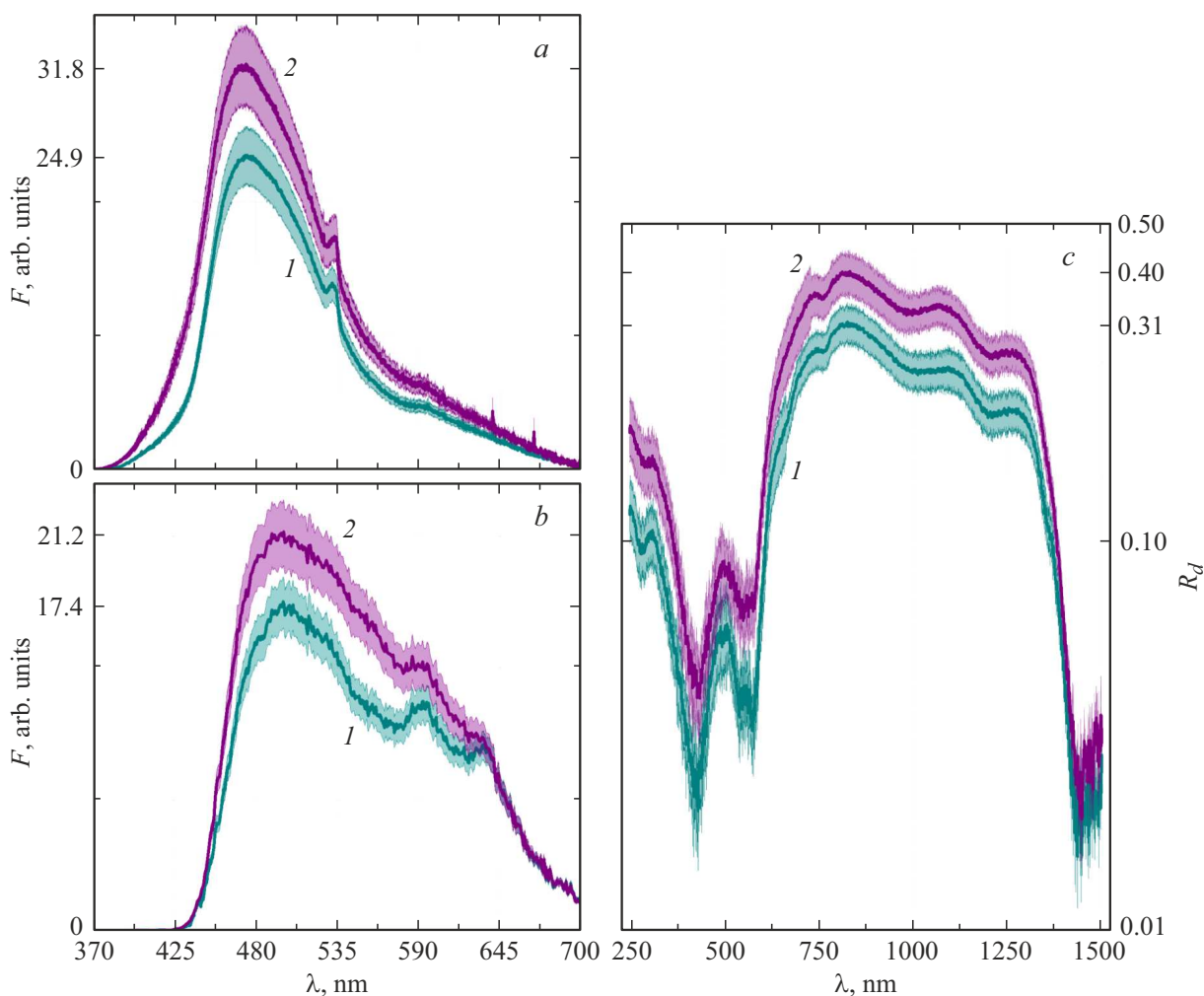
3. Построение целевой функции и ее минимизация:  $F = \left( R_d^{\text{Exp}}(\lambda) - R_d^{\text{Calc}}(\lambda) \right)^2$ .

4. Реализация процедуры минимизации на основе симплексного метода Нелдера–Мида [25] до выполнения условия:

$$\frac{|R_t^{\text{Exp}}(\lambda) - R_t^{\text{Calc}}(\lambda)|}{R_t^{\text{Exp}}(\lambda)} \leq 0.1.$$

### 3. Результаты и обсуждение

На рис. 2 показаны типичные спектры лазерно индуцированной флуоресценции  $F(\lambda)$  (a и b) и коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  (c) для интактных тканей печени (кривая 1) и при зондировании холодной плазмой с экспозицией 7 min (кривая 2). Как видно из рисунка, для спектров  $F(\lambda)$  и  $R_d(\lambda)$  исследуемых биотканей наблюдается как ряд общих закономерностей, так и отличительных особенностей, что указывает на возможность применения спектрально-оптических методов в мониторинге эффективности плазменного зондирования. В частности, при возбуждении на длине волн 355 nm (рис. 2, a) для спектрального контура флуоресценции  $F_{355}(\lambda)$  характерно наличие главного максимума вблизи длин волн  $472 \pm 3 \text{ nm}$  и двух компонент при  $532 \pm 2$  и  $593 \pm 10 \text{ nm}$ . Более отчетливо длинноволновые компоненты просматриваются при возбуждении спектров  $F_{410}(\lambda)$  на длине волны 410 nm (рис. 2, b), для которых максимум интенсивности приходится на область длин волн  $500 \pm 5 \text{ nm}$  и полосы свечения вблизи  $560 \pm 5$ ,  $593 \pm 3$  и  $635 \pm 3 \text{ nm}$ . В то же время наличие минимумов в спектральном интервале длин волн 400–440 и 530–580 nm, по-видимому, вызвано присутствием крови в биотканях и реабсорбцией фотонов флуоресценции



**Рис. 2.** Спектры лазерно индуцированной флуоресценции  $F(\lambda)$ , полученные при возбуждении на длинах волн 355 (а) и 410 nm (b), а также спектры коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  (с) для интактных биотканей (1) и биотканей, обработанных плазменным излучением длительностью 7 min (2).

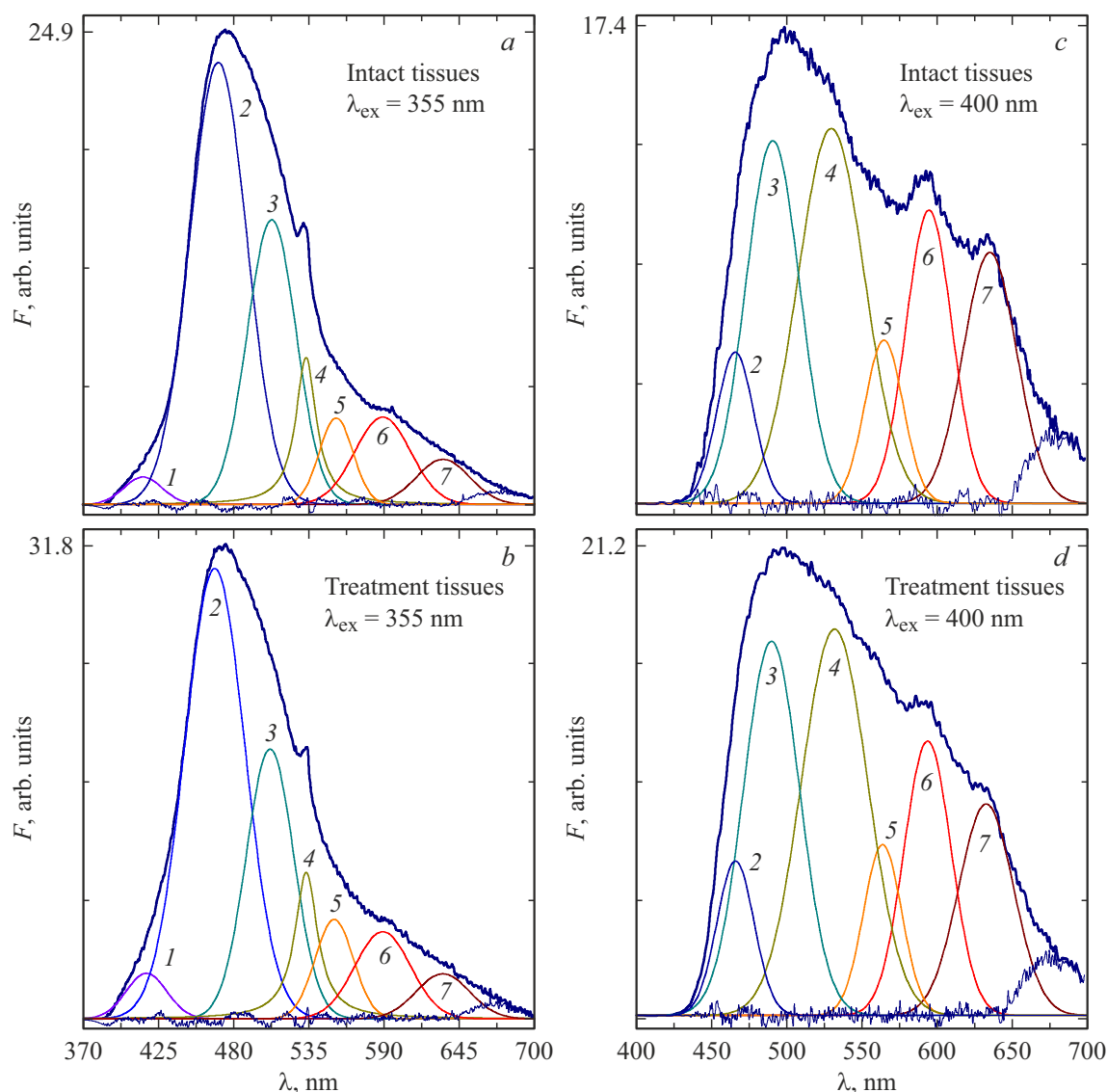
вблизи полос поглощения гемоглобина. Причем воздействие плазменного излучения при общем увеличении интенсивности спектров  $F(\lambda)$  до 1.5 раз сопровождается как выравниванием „прогибов“ спектрального контура, так и ослаблением свечения на длинах волн  $532 \pm 2$ ,  $593 \pm 10$  и  $635 \pm 3$  nm на 20–25%.

Для спектров коэффициента диффузного отражения (рис. 2, c) на фоне обратного рассеяния, которое определяет уровень  $R_d(\lambda)$ , отчетливо просматриваются спектральные полосы поглощения крови ( $280 \pm 5$ ,  $420 \pm 3$ ,  $545 \pm 3$  и  $575 \pm 3$  nm), липидов и воды ( $760 \pm 5$ ,  $990 \pm 5$ ,  $1190 \pm 5$ ,  $1450 \pm 5$  nm), вблизи которых спектр  $R_d(\lambda)$  приобретает глубокие минимумы [21,24]. Типичные значения коэффициента отражения, характерные для интактных тканей печени, лежат в пределах от  $0.022 \pm 0.05$  в ультрафиолетовой и ближней инфракрасной областях до  $0.31 \pm 0.03$  — для области терапевтического окна. При этом плазменно индуцированные эффекты приводят к двукратному росту интенсивности

отражения преимущественно в коротковолновой области спектра, тогда как в диапазоне окна прозрачности увеличение  $R_d(\lambda)$  не превышает 30%.

Использование метода среднеквадратичного отклонения в качестве статистического анализа спектральных данных позволило установить, что максимальный разброс значений  $F(\lambda)$  и  $R_d(\lambda)$  не превышал значений 10–15% на всем спектральном интервале исследования, за исключением области длин волн 350 и 420 nm, где разброс для  $R_d(\lambda)$  достигал 25–30%.

В целях получения количественной информации о динамике биохимической активности эндогенных флуорофоров в работе по мере плазменного зондирования выполнялся контурный анализ спектров флуоресценции исследуемых биообъектов. Процедура спектрального разложения заключалась в применении комбинации функций Гаусса и Лоренца и подробно изложена в работе [26].



**Рис. 3.** Контурный анализ спектров лазерно индуцированной флуоресценции  $F(\lambda)$  для intactных тканей печени (*a, c*) и при воздействии низкотемпературной плазмы с экспозицией 7 min (*b, d*). Цифрами показаны спектральные компоненты разложения, соответствующие эндогенным флуорофорам.

На рис. 3 показаны результаты разложения спектров флуоресценции  $F_{355}(\lambda)$  и  $F_{410}(\lambda)$  для intactных тканей печени (*a* и *c*) и при воздействии холодной плазмы (*b* и *d*). Как видно из рисунка, спектры флуоресценции исследуемых биотканей сформированы как минимум семью группами флуорофоров (соответственно номерам кривых на рисунке). Согласно данным [27–29], из общего числа биологически активных веществ, наиболее характерных для тканей печени, среди этих семи групп можно выделить следующие.

\* Группа 2 — коферменты NADH/NAD(P)H (восстановленная форма никотинамида аденин динуклеотида (фосфата)) с максимумом возбуждения/эмиссии при длинах волн  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim (336, 351)/470 \pm 5$  nm.

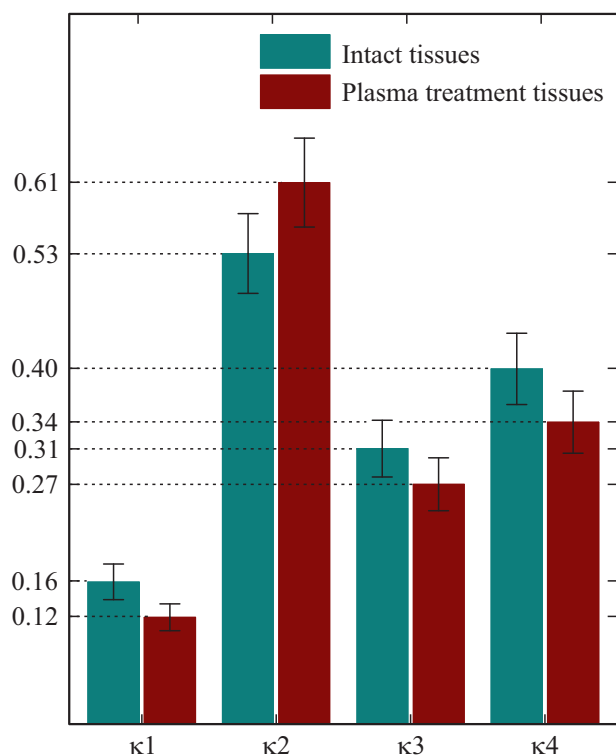
\* Группа 3 — витамин А, с максимумом  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim (315, 380)/510 \pm 5$  nm.

\* Группа 4 — производные флавиновых групп (FAD — окисленная форма флавиноадениндинуклеотида и FMN — флавиномононуклеотида) с  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim (380, 450)/525 \pm 10$  nm.

\* Группа 5 — липиды (липофусцин, сероид),  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 340\text{--}395/550 \pm 5$  nm.

\* Группы 6 и 7 — производные эндогенных порфиринов с максимумом возбуждения/эмиссии в области длин волн  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 380\text{--}450/590\text{--}690$  nm.

При этом группа 1, соответствующая свечению структурных белков — коллагена и эластина (максимум  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} \sim 325/405 \pm 5$  nm) в спектрах  $F_{355}(\lambda)$  и группа 2 флуорофоров в спектрах  $F_{410}(\lambda)$  сильно ослаблены спектральными характеристиками запирающих светофильтров. По этой причине их роль при дальнейшем



**Рис. 4.** Диаграмма спектральных индексов  $\kappa_1 - \kappa_4$ , характеризующих динамику вкладов эндогенных флуорофоров в суммарные спектры флуоресценции тканей печени при зондировании излучением холодной плазмы с экспозицией 7 min.

анализе соответствующих спектров флуоресценции не учитывалась.

Анализ результатов спектрального разложения  $F(\lambda)$  показывает, что в процессе плазменного воздействия наиболее явные изменения наблюдаются в соотношениях и вкладах 2-й и 4-й групп. Известно, что молекулы NADH и группа флавиновых производных концентрируются преимущественно в митохондриях гепатоцитов и функционируют как коферменты дегидрогеназ в окислительно-восстановительных реакциях, выступая акцептором электронов субстрата. Восстанавливаясь, хромофор  $\text{NAD}^+$  накапливает положительно заряженные ионы водорода  $\text{H}^+$  и приобретает яркую флуоресценцию с небольшим сдвигом в коротковолновую область спектра, одновременно катализируя восстановление флавинового кофермента FAD. В силу этого любые изменения в клеточном метаболизме влияют на концентрацию окисленных и восстановленных форм этих флуорофоров и могут быть выявлены в динамике соотношений их спектральных компонент.

Основываясь на методике количественной оценки дыхательной активности митохондрий [29–31], в работе оценивалась степень энергетического обмена биотканей путем нормировки интенсивности свечения флавиновых групп —  $F_{\text{FAD}}$  к интенсивности свечения  $\text{NAD(P)H}$  —  $F_{(\text{NAD(P)H})}$ , как отношение площадей под кривыми компо-

нент разложения —  $S_{\text{ex/cm}}$ :

$$\kappa_1 = \frac{S_{355/530}^4}{S_{355/530}^4 + S_{355/470}^2} = \frac{F_{\text{FAD}}}{F_{\text{FAD}} + F_{\text{NAD(P)H}}}$$

Наличие информации о других компонентах разложения спектров флуоресценции позволяет ввести в анализ ряд дополнительных показателей функционирования биотканей, которые по аналогии с индексом  $\kappa_1$  могут быть определены как

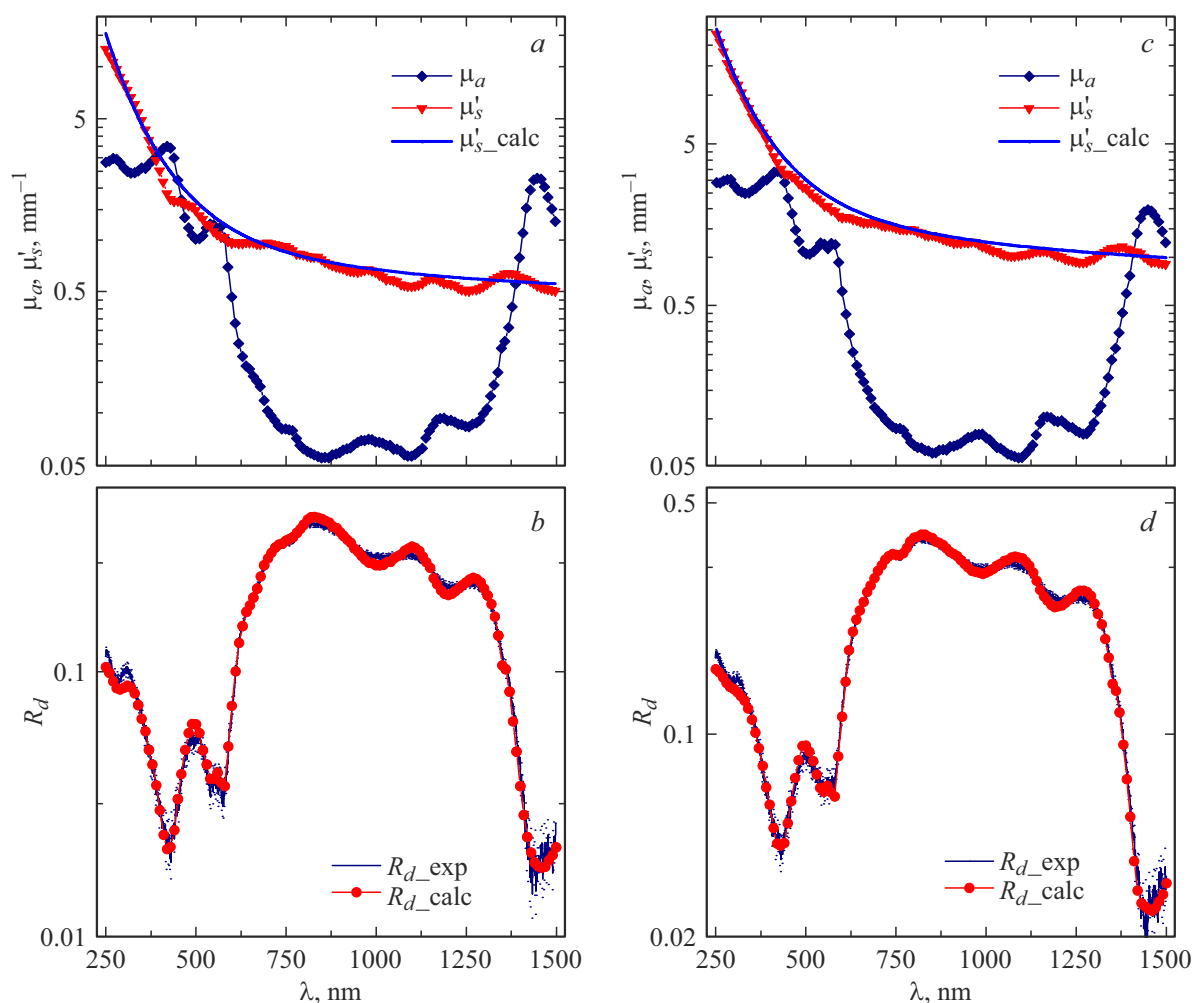
$$\begin{aligned} \kappa_2 &= \frac{(S_{355/510}^3 + S_{410/510}^3)/2}{(S_{355/510}^3 + S_{410/510}^3)/2 + (S_{355/530}^4 + S_{410/530}^4)/2} \\ &= \frac{F_{\text{Vit}_A}}{F_{\text{Vit}_A} + F_{\text{FAD}}}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \kappa_3 &= \frac{(S_{355/560}^5 + S_{410/560}^5)/2}{(S_{355/560}^5 + S_{410/560}^5)/2 + (S_{355/530}^4 + S_{410/530}^4)/2} \\ &= \frac{F_{\text{Lipids}}}{F_{\text{Lipids}} + F_{\text{FAD}}}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \kappa_4 &= \frac{(S_{355/595}^6 + S_{355/635}^6 + S_{410/595}^6 + S_{410/635}^6)/4}{(S_{355/595}^6 + S_{355/635}^6 + S_{410/595}^6 + S_{410/635}^6)/4 + (S_{355/530}^4 + S_{410/530}^4)/2} \\ &= \frac{F_{\text{Porph}}}{F_{\text{Porph}} + F_{\text{FAD}}}, \end{aligned}$$

где  $\kappa_2$  — антиоксидантный индекс,  $\kappa_3$  — индекс деградации внутриклеточных органелл и  $\kappa_4$  — индекс деградации гемопротеинов.

Систематизированные данные индексов  $\kappa_1 - \kappa_4$  для интактных тканей печени и при воздействии плазменного облучения (САР) с экспозицией 7 min приведены на рис. 4. Как видно из рисунка, плазменная обработка биотканей приводит к снижению индекса дыхательной активности  $\kappa_1$  до 20%. Поскольку индекс  $\kappa_1$  обусловлен флуоресценцией пиридиновых и флавиновых нуклеотидов, находящихся преимущественно в митохондриях гепатоцитов, то его наблюдаемая динамика обусловлена уменьшением концентрации окисленных флавиновых производных и повышением концентрации NADH. В пользу данного утверждения свидетельствует также и тот факт, что соотношение  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  в митохондриях на два порядка выше по сравнению с их содержанием в цитоплазме. В совокупности с полученными физиологическими данными (степенью кровенаполнения и оксигенации биотканей) можно также утверждать, что накопление NADH в митохондриях при действии плазмы не связано с условиями гипоксии и активацией анаэробного гликолиза, а индекс дыхательной активности  $\kappa_1$ , отражающий редокс-состояние митохондрий печени, обусловлен динамикой I и II комплексов дыхательной цепи [29–31].



**Рис. 5.** Спектры коэффициентов оптического поглощения  $\mu_a(\lambda)$  и транспортного рассеяния  $\mu'_s(\lambda)$ , а также спектры коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  и его реконструкция  $R_d\text{-Calc}$  для тканей печени до (a, b) и после облучения холодной плазмой (c, d). Сплошная кривая — аппроксимация коэффициента транспортного рассеяния  $\mu'_s\text{-Calc}$ .

Кроме того, известно, что активация переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий может сопровождаться усилением генерации свободных радикалов, которые оказывают как положительное, так и отрицательное влияние, связанное с деградацией макромолекул и клеточных структур. В отличие от других органов печень обладает мощной антиоксидантной системой (ферментативной и неферментативной), блокирующей окислительный процесс и нейтрализующей действие свободных радикалов. При этом ключевыми антиоксидантами являются жирорастворимые витамины — витамин А, локализованный преимущественно в мембранных структурах гепатоцитов и обеспечивающий защиту липидно-белковой матрицы [29,32]. В этой связи рост индекса антиоксидантной защиты  $\kappa_2$  на 15% для зондированных биотканей указывает на увеличение концентрации ретиноидов в среде. Поскольку витамин А является антиоксидантом экзогенного происхождения, то обнаруженное усиление свечения связано с его мобилизацией из крови и депонированием в клетках печени.

Это, в свою очередь, позволяет обсуждать характер терапевтического действия холодной плазмы посредством усиления антиоксидантной защиты.

Данное предположение находит свое подтверждение в динамике индексов деградации внутриклеточных органелл  $\kappa_3$  и гемопротеинов  $\kappa_4$ , вызванное снижением концентрации липофусцина и порфиринов до 30%. Известно, что эти вещества образуются под действием активных форм кислорода в результате свободно-радикального окисления клеточных липидов и остатков белков, и их главным источником является неполная деградация поврежденных митохондрий [29,33,34]. Таким образом, наблюдаемые изменения индексов  $\kappa_3$  и  $\kappa_4$  также свидетельствует в пользу благоприятного действия плазменного излучения на клеточные структуры, гепатоциты и печеночной ткани в целом.

Анализ коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  при помощи инверсного метода Монте-Карло позволил выявить динамику оптико-спектральных свойств биотканей по мере воздействия холодной плазмы. На рис. 5



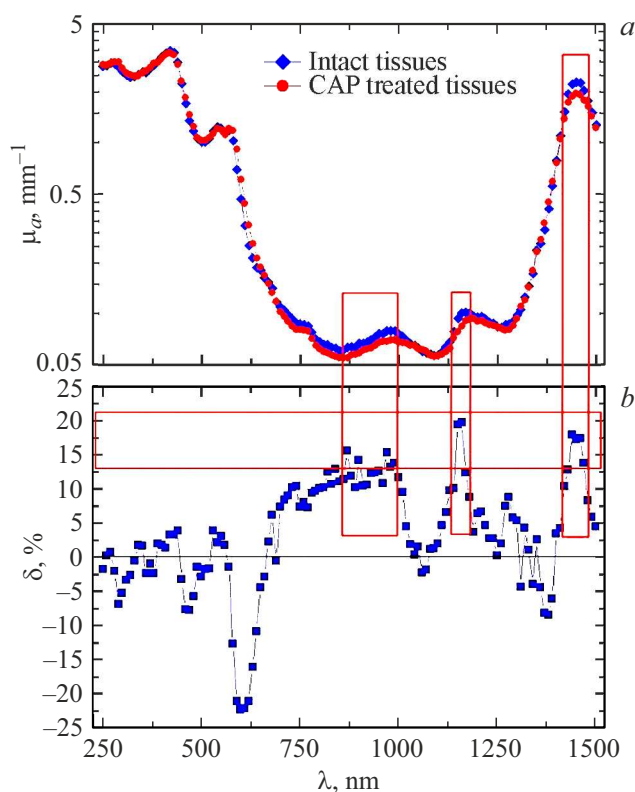
показаны спектры коэффициентов оптического поглощения  $\mu_a(\lambda)$  и транспортного рассеяния  $\mu'_s(\lambda)$ , а также их реконструкция в спектры коэффициента отражения для интактных тканей печени (a, b) и тканей, подвергшихся плазменной обработке (c, d).

Как видно из рисунка, спектры коэффициента поглощения  $\mu_a(\lambda)$  во многом инверсно симметричны спектрам коэффициента отражения, однако в отличие от  $R_d(\lambda)$  обнаруживают ряд дополнительных компонент. Сопоставление полученных результатов с известными литературными данными [21,24] показывает, что в видимой области спектра коэффициент  $\mu_a(\lambda)$  образован комплексом эндогенных хромофоров, к которым следует отнести окси- и дезоксигемоглобин с полосами поглощения на длинах волн  $280 \pm 5$ ,  $350 \pm 5$ ,  $418 \pm 5$ ,  $545 \pm 5$  и  $577 \pm 5$  nm. Спектральная компонента вблизи длин волн  $650 \pm 5$  nm обусловлена, по-видимому, поглощением порфириновых групп. Вместе с этим наличие спектральных компонент в ближнем инфракрасном диапазоне вызвано присутствием в биотканях липидных комплексов и воды с поглощением в области  $760 \pm 5$ ,  $980 \pm 5$ ,  $1185 \pm 5$ ,  $1450 \pm 5$  nm. Максимум поглощения приходится на длины волн  $420 \pm 3$  nm (полоса Сорэ) и  $1450 \pm 10.0$  nm, где  $\mu_a(\lambda)$  достигает значений соответственно  $3.4 \pm 0.4$  и  $2.25 \pm 0.1$  mm<sup>-1</sup>. Ближе к окну прозрачности коэффициент поглощения монотонно снижается и на спектральном участке 700–900 nm уменьшается до 100 раз. При этом взаимодействие плазменного излучения с биотканями приводит к незначительным изменениям коэффициента поглощения (в пределах 10%) преимущественно в УФ и видимой области спектра с ослаблением полосы поглощения эндогенных порфиринов, а также к снижению значений  $\mu_a(\lambda)$  до 20% на длинах волн поглощения молекул воды.

Наиболее явные отличия в спектрах коэффициента поглощения исследуемых биотканей видны на рис. 6. Определение дифференцированного спектра поглощения как

$$\delta(\lambda) = \left( \frac{\mu_a(\lambda)_{\text{Intact tissues}}}{\mu_a(\lambda)_{\text{CAP treated tissues}}} - 1 \right) \times 100\%$$

позволило выделить три спектральных интервала, соответствующих полосам поглощения воды вблизи длин волн  $980 \pm 5$ ,  $1185 \pm 5$  и  $1450 \pm 5$  nm, для которых расхождение в интенсивности поглощения составляет 15–20%. Наибольший интерес из указанных вызывает спектральная область при  $1450 \pm 5$  nm, где коэффициент поглощения для интактных образцов биотканей составляет  $\mu_a(1450) = 2.25$  mm<sup>-1</sup>, а для обработанных плазмой  $\mu_a(1450) = 1.9$  mm<sup>-1</sup>. Поглощение на длинах волн  $980 \pm 5$  и  $1197 \pm 5$  nm значительно слабее (соответственно  $0.08 \pm 0.01$  и  $0.1 \pm 0.01$  mm<sup>-1</sup>), помимо воды на эти области могут быть наложены полосы поглощения других хромофоров, например липидов, присутствующих в тканях печени в концентрации до 6% и др. Все это, по-видимому, и является причиной смещения максимумов в спектрах  $\mu_a(\lambda)$  биотканей с 970→980



**Рис. 6.** (a) Спектры коэффициента оптического поглощения для интактных тканей печени и для биотканей, обработанных холодной плазмой длительностью 7 min. (b) Дифференцированный спектр коэффициента поглощения интактных и облученных биотканей; выделены три спектральные интервала, где коэффициенты поглощения имеют максимальные ( $\delta > 10\%$ ) различия: 860–1000, 1130–1200 и 1430–1470 nm.

и с 1197→1185 nm. При этом сопоставление спектра поглощения воды [24] с данными коэффициента поглощения приводит к следующим значениям объемной доли воды и липидов для интактных биообъектов:  $V_W = 72\%$  и  $V_L = 4.5\%$ , а для облученных:  $V_W = 62.5\%$  и  $V_L = 3.8\%$  (таблица).

В сравнении с коэффициентом поглощения спектральный контур коэффициента транспортного рассеяния  $\mu'_s(\lambda)$  представляет собой гладкую кривую, плавно снижающуюся в сторону больших длин волн со спектральными минимумами в области полос интенсивного поглощения гемоглобина и воды. Данный факт может быть вызван как ростом неоднородности мнимой составляющей комплексного показателя преломления среды вблизи полос сильного поглощения, так и ростом поглощения в области сильного рассеяния, когда вследствие увеличения числа актов взаимодействия с эндогенными хромофорами на длине свободного пробега уменьшается количество фотонов многократного рассеяния [35,36].

Анализ спектральной зависимости коэффициента анизотропии рассеяния путем его аппроксимации выражением (4) позволил с хорошей точностью спрогнозировать  $\mu'_s(\lambda)$  функцией, которая для интактных биотканей

Количественные характеристики содержания эндогенных хромофоров, характеризующих динамику физиологических свойств для тканей печени при воздействии низкотемпературной плазмы

Физиологические параметры	Интактная биоткань	Биоткани при плазменной обработке
$V_B$ — объемная доля крови, %	$9.3 \pm 0.4$	$9.0 \pm 0.4$
$\alpha$ — степень оксигенации биоткани, %	$84.5 \pm 2.0$	$89.2 \pm 2.0$
$V_W$ — объемная доля воды, %	$72.0 \pm 2.0$	$62.5 \pm 2.0$
$V_{Br}$ — объемная доля билирубина, %	$2.1 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.2$
$V_L$ — объемная доля липидов, %	$4.2 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.4$
$A_{Mie}/B_{Mie}$	87.9/0.71	181.2/0.74
$A_{Ray}/B_{Ray}$	$5.16 \cdot 10^{10}/4$	$1.25 \cdot 10^{11}/4$

выглядит как

$$\mu'_s(\lambda)_{Calc} = 87.9\lambda^{-0.71} + 5.16 \cdot 10^{10}\lambda^{-4},$$

где первое слагаемое функции с волновым экспонентом  $B_M \sim 0.71$  отвечает за светорассеяние, вызванное крупными гистоструктурами печени (ядрами и мембранами гепатоцитов, сплетениями волокон соединительной ткани и др.). Второе слагаемое с экспонентом  $B_R \sim 4$  соответствует малым (релеевским) частицам, например, митохондриям, лизосомам и другим элементам цитоплазмы гепатоцитов, а также отдельным коллагеновым волокнам стромы и надмолекулярным комплексам. Причем, согласно полученному выражению, основной вклад в формировании коэффициента транспортного рассеяния вносят релеевские частицы, роль которых в коротковолновой области спектра  $\mu'_s(\lambda)$  является доминирующей, а их концентрация во много раз превышает концентрацию крупных частиц. Это находит свое подтверждение в гистологической картине печени, согласно которой митохондрии занимают более 25% от общего объема гепатоцитов (в среднем 33 митохондрий на  $\mu m^2$ ) [37], и также хорошо согласуется с данными работ [38,39].

Относительно интактных биотканей процессы плазменной обработки приводят к двукратному росту коэффициента транспортного рассеяния с увеличением угла наклона спектральной кривой (рис. 5, с), для которой аппроксимирующая функция принимает следующий вид:

$$\mu'_s(\lambda)_{Calc} = 181.2\lambda^{-0.74} + 1.25 \cdot 10^{11}\lambda^{-4}.$$

Согласно полученным выражениям, это означает, что на фоне незначительного уменьшения эффективных размеров рассеивающих частиц наблюдается увеличение их концентрации до 2.5 раз.

Использование методики (1)–(4) позволило по величине и форме спектральной зависимости коэффициентов

$\mu_a(\lambda)$  и  $\mu'_s(\lambda)$  оценить динамику некоторых физиологических и морфофункциональных характеристик исследуемых биообъектов (таблица). В частности, помимо динамики морфологических характеристик воздействие плазменного излучения длительностью до 7 min вызывает снижение содержания воды  $V_W$ , липидов  $V_L$  и билирубина  $V_{Br}$  до 20%, а также рост показателя насыщения кислородом  $\alpha$  до 10% при практически неизменных значениях степени кровенаполнения биотканей.

Обнаруженные физиологические изменения в тканях печени могут свидетельствовать в пользу развития первичных признаков обезвоживания. По-видимому, изменения в концентрациях эндогенных хромофоров, а также обратимые нарушения гистоструктуры гепатоцитов и архитектоники печеночной паренхимы вызваны не столько денатурацией структурных протеинов и гемоглобина, сколько развитием процессов компенсаторной дегидратации клеточных ультраструктур, клеток и самих тканей. С учетом результатов флуоресцентного анализа можно предположить, что это приводит к замедлению метаболической активности митохондрий путем подавления переноса электронов по дыхательной цепи, что, как известно, является причиной роста содержания кислорода и, как следствие, увеличение концентрации NADH. В то же время одним из эффектов кумуляции кислорода является замедление генерации свободных радикалов, которое проявляется в виде снижения содержания продуктов свободно-радикального окисления макромолекул липидных и порфириновых комплексов [29,40].

В завершении следует заметить, что, несмотря на косвенный анализ био- и физико-химических эффектов, результаты проведенных исследований во многом согласуются, дополняют друг друга и позволяют в формате *in situ* оценить ряд важнейших функциональных характеристик взаимодействия низкотемпературной плазмы с биообъектами. Однако более глубокое изучение этих процессов требует проведения дополнительных как спек-

троскопических, так и микроскопических исследований. В частности, необходимо выявление механизмов влияния светорассеяния и реабсорбции на формирование истинных спектров флуоресценции, а также выявление особенностей воздействия холодной плазмы на гистоморфологические и гистохимические характеристики биотканей. Детальное внимание этим исследованиям будет уделено в последующих публикациях.

#### 4. Заключение

Таким образом, обобщая результаты исследования воздействия плазменного излучения на спектрально-оптические свойства биотканей, можно выделить следующее.

1. Спектры флуоресценции  $F(\lambda)$  исследуемых биотканей сформированы свечением коферментов дегидрогеназ NADH и FAD<sup>+</sup>, витамином А, а также липидами и комплексом эндогенных порфиринов, на длинах волн излучения которых ( $475\pm 3$ ,  $510\pm 5$ ,  $531\pm 2$ ,  $593\pm 5$  и  $635\pm 2$  nm) наблюдаются экстремумы.

Воздействие холодной плазмы приводит как к увеличению общего уровня интенсивности флуоресценции до 1.5 раз, так и к изменению формы спектральных контуров спектров  $F(\lambda)$ . В частности, наблюдается усиление интенсивности флуоресценции NAD(P)H и витамина А — до 30% при ослаблении свечения липофусцина и порфириновых комплексов на 25%. Данный факт находит отражение в динамике спектральных индексов в виде снижения индексов дыхательной активности ( $\kappa_1$ ), деградации внутриклеточных органелл ( $\kappa_3$ ) и гемопротенинов ( $\kappa_4$ ) до 30% и увеличение индекса антиоксидантной защиты ( $\kappa_2$ ) на 15–20%.

2. Спектры коэффициента диффузного отражения  $R_d(\lambda)$  тканей печени образованы спектральными полосами поглощения окси- и дезоксигемоглобина ( $280\pm 5$ ,  $350\pm 5$ ,  $418\pm 5$ ,  $545\pm 5$  и  $577\pm 5$  nm), а также липидных комплексов и воды ( $760\pm 5$ ,  $980\pm 5$ ,  $1185\pm 5$ ,  $1450\pm 5$  nm), вблизи длин волн которых коэффициент поглощения  $\mu_a(\lambda)$  приобретает характерные максимумы.

3. Воздействие плазменного излучения приводит к росту коэффициента диффузного отражения до 2 раз за счет увеличения коэффициента транспортного рассеяния  $\mu'_s(\lambda)$  до 2 раз, что обусловлено незначительным уменьшением эффективных размеров рассеивающих частиц и увеличением их концентрации до 2.5 раз. В то же время для коэффициента поглощения эти изменения связаны со снижением содержания воды, липидов и билирубина до 20%, а также ростом показателя насыщения кислородом до 10% при неизменных значениях степени кровенаполнения биотканей.

4. Анализ результатов спектрально-оптических исследований свидетельствует в пользу терапевтического действия низкотемпературной плазмы посредством усиления антиоксидантной защиты и развитием процессов компенсаторной дегидратации.

#### Финансирование

Работа выполнялась с использованием оборудования центра коллективного пользования Дагестанского государственного университета „Аналитическая спектроскопия“, при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-32-90180.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### Список литературы

- [1] A. Stancampiano, D. Forgione, E. Simoncelli, R. Laurita, R. Tonini, M. Gherardi, V. Colombo. *J. Adhesive Dentistry*, **21** (3), 229 (2019).
- [2] A. Mariachiara, A. Venturuzzo, A. Gelmetti, E. Guasco, S. Bassissi, M. Rossi, P. Calzavara-Pinton. *Clinical Plasma Medicine*, **19–20**, 100110 (2020). DOI: 10.1016/j.cpm.2020.100110
- [3] Th. Bernhardt, M. Semmler, M. Schäfer, S. Bekeschus, S. Emmert, L. Boeckmann. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2019**, 3873928 (2019). DOI: 10.1155/2019/3873928
- [4] E.A. Golubitskaya, O.S. Troitskaya, E.V. Yelak, P.P. Gugin, V.A. Richter, I.V. Schweigert, D.E. Zakrevsky, O.A. Koval. *Acta Natura*, **11** (3), 16 (2019).
- [5] E. Sysolyatina, M. Vasiliev, M. Kurnaeva, I. Kornienko, O. Petrov, V. Fortov, A. Gintsburg, E. Petersen, S. Ermolaeva. *J. Phys. D.*, **49**, 294002 (2016).
- [6] N.Y. Babaeva, G.V. Naidis. *Trends in Biotechnology*, **36** (6), 603 (2018).
- [7] K. Kletschkus, N. Gelbrich, M. Burchardt, A. Kramer, S. Bekeschus, M. Stope. *Health Physics*, **119** (1), 153 (2020).
- [8] D. Xu, Q. Cui, Y. Xu, Zh. Liu, Z. Chen, W. Xia, H. Zhang, D. Liu, H. Chen, M. Kong. *AIP Advances*, **8** (10), 105219-1 (2018). DOI: 10.1063/1.5046353
- [9] I. Trizio, E. Sardella, V. Rizzi, G. Dilecce, P. Cosma, M. Schmidt, T. Woedtke, R. Gristina, P. Favia. *Plasma Medicine*, **6** (1), 13 (2016).
- [10] X. Sua, Y. Tianb, H. Zhoua, Y. Lib, Zh. Zhanga, B. Jianga, B. Yanga, J. Zhang, J. Fang. *Appl. Environ. Microbiol.*, **84** (9), e02836-17 (2018). DOI: 10.1128/AEM.02836-17
- [11] F. Saadati, H. Mahdikia, H.-A. Abbaszadeh, M.-A. Abdollahifar, M. Khoramgah, B. Shokri. *Scientific Reports*, **8** (1), 7689 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-25990-9
- [12] A. Akbiyik, D. Sari, U.K. Ercan, Y. Uyanikgil, H. Tasli, C. Tomruk, Y.H. Usta. *J. Appl. Microbiol.*, **131** (2), 973 (2020).
- [13] K.V. Pozhar, M.O. Mikhailov, E.A. Polyakova, E.L. Litinskaiya, Yu.E. Aboleymova. *Biomedical Engineering*, **55** (2), 84 (2021).
- [14] V.D. Genin, A.B. Bucharskaya, E.A. Genina, G.S. Terentyuk, N.G. Khlebtsov, V.V. Tuchin, A.N. Bashkatov. In: *Proc. of SPIE, Saratov Fall Meeting 2020: Optical and Nanotechnologies for Biology and Medicine* (SPIE, USA, 2020), Vol. 118450. DOI: 10.1117/12.2590422
- [15] X. He, D. Hu, X. Fu, X. Rao. *Postharvest Biol. Technol.*, **179**, 111570 (2021). DOI: 10.1016/j.postharvbio.2021.111570

- [16] V.V. Tuchin, J. Popp, V. Zakharov. *Multimodal Optical Diagnostics of Cancer*. (Springer Nature Switzerland AG, Switzerland, 2020). DOI: 10.1007/978-3-030-44594-2
- [17] J.H. Lam, K.J. Tu, S. Kim. *Biomed. Opt. Expr.*, **12** (6), 3091 (2021).
- [18] F. Ghasemi, P. Parvin, N. Sadat, H. Motlagh, S. Abachi. *Biomed. Opt. Expr.*, **8** (2), 512 (2017).
- [19] E. Tsibulskaya, N. Maslov. *J. Chemometrics*, **35** (6), e3343 (2021).
- [20] A.A. Moghaddam, B. Sajad, F.M. Nia, S.H. Madani. *J. Lasers Med. Sci.*, **12**, e10 (2021). DOI: 10.34172/jlms.2021.10
- [21] S.L. Jacques. *Phys. Med. Biol.*, **58** (11), 37 (2013).
- [22] A.J. Welch, M.J.C. Van Gemert. *Optical-Thermal Response of Laser Irradiation Tissues*, 2nd ed. (Springer Science+Business Media, Luxembourg, 2011). DOI: 10.1007/978-90-481-8831-4
- [23] В.В. Тучин. *Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике*, 2-е изд. (Физматлит, М., 2013).
- [24] S.A. Prahl. *PhotochemCAD* [Электронный ресурс]. URL: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/index.html>
- [25] Б. Банди. *Методы оптимизации*, под ред. В.А. Вольнского. (Радио и связь, М., 1988).
- [26] K.M. Giraev, K.S. Bekshokov, N.A. Ashurbekov, N.M. Abdullaeva, E.Kh. Israpov. *Opt. Spectr.*, **122** (4), 632 (2017).
- [27] J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. (Springer Science+Business Media, Luxembourg, 2006). DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4
- [28] A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Bottiroli, M. Vairetti. *Liver International*, **38**, 1160 (2018).
- [29] Д. Нельсон, М. Кокс. *Основы биохимии Ленинджера*. (Лаборатория знаний, М., 2020), Том 2.
- [30] G.T. Hanson, R. Aggeler, D. Oglesbee. *J. Biol. Chem.*, **279**, 13044 (2004).
- [31] I.E. Hassinen. *J. Innovative Optical Health Sci.*, **7**, 1350058-6 (2014).
- [32] R. Carmona, S. Barrena, R. Muñoz-Chápuli. *J. Dev. Biol.*, **7** (2), 10 (2019).
- [33] A. Höhn, T. Grune. *Redox Biology*, **1**, 140 (2013). DOI: [doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.006](https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.006)
- [34] S. Bayati, R. Yazdanparast. *Iran Biomed J.*, **15** (4), 134 (2011).
- [35] А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, М.Д. Козинцева, В.И. Кочубей, С.Ю. Городков, В.В. Тучин. *Опт. и спектр.*, **120** (1), 6 (2016).
- [36] А.Н. Башкатов, Е.А. Генина, В. Кочубей. *Квант. электрон.*, **44**, 779 (2014).
- [37] О.Д. Мяделец. *Гистология, цитология и эмбриология человека*. (ВГМУ, Витебск, 2016).
- [38] V. Beauvoit, M. Kimura, V. Chance. *Biophys. J.*, **67**, 2501 (1994).
- [39] J.M. Schmitt, G. Kumar. *Appl. Opt.*, **37**, 2788 (1998).
- [40] V. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, Great Britain, 2015). DOI:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001