
ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

OPTICS AND SPECTROSCOPY

УДК 535.371+615.277.3

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ИСТОЧНИКА ФОТОВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

**М. П. САМЦОВ¹⁾, Д. С. ТАРАСОВ¹⁾,
Е. С. ВОРОПАЙ²⁾, Л. С. ЛЯШЕНКО²⁾, П. Т. ПЕТРОВ³⁾,
В. М. НАСЕК³⁾, А. О. САВИН³⁾, Р. Д. ЗИЛЬБЕРМАН³⁾**

¹⁾Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко БГУ,
ул. Курчатова, 7, 220108, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

³⁾Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, 220141, г. Минск, Беларусь

Приведены результаты исследований в опытах *in vitro* и *in vivo* эффективности повреждения опухолевых тканей при фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором на основе индотрикарбодцианинового красителя с использованием излучения полупроводникового лазера с длиной волны 740 нм или светодиода с максимумом

Образец цитирования:

Самцов МП, Тарасов ДС, Воропай ЕС, Ляшенко ЛС, Петров ПТ, Насек ВМ, Савин АО, Зильберман РД. Оптимизация параметров источника фотОВОЗДЕЙСТВИЯ при фотохимиотерапии опухолевых тканей лабораторных животных. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика*. 2019;1:19–26.

For citation:

Samtsov MP, Tarasov DS, Voropay ES, Lyashenko LS, Petrov PT, Nasek VM, Savin AO, Zilberman RD. Photodynamic therapy using the photosensitizer based on tricarbo-cyanine dye with polyethylene glycol on a model for tumor bearing laboratory animals. *Journal of the Belarusian State University. Physics*. 2019;1:19–26. Russian.

Авторы:

Михаил Петрович Самцов – доктор физико-математических наук, доцент; заведующий лабораторией спектроскопии.

Дмитрий Сергеевич Тарасов – научный сотрудник лаборатории спектроскопии.

Евгений Семенович Воропай – доктор физико-математических наук, профессор; профессор кафедры лазерной физики и спектроскопии физического факультета.

Людмила Сергеевна Ляшенко – кандидат физико-математических наук, доцент; доцент кафедры лазерной физики и спектроскопии физического факультета.

Петр Тимофеевич Петров – кандидат химических наук; заведующий отделом фармакологии и фармации.

Владимир Михайлович Насек – кандидат медицинских наук; заведующий лабораторией токсикологии.

Александр Олегович Савин – научный сотрудник лаборатории токсикологии.

Роман Дмитриевич Зильберман – научный сотрудник лаборатории токсикологии.

Authors:

Michael P. Samtsov, doctor of science (physics and mathematics), docent; head of the laboratory of spectroscopy.

samtsov@bsu.by

Dmitriy S. Tarasov, researcher at the laboratory of spectroscopy.

dmitrij-tarasov@list.ru

Eugeni S. Voropay, doctor of science (physics and mathematics), full professor; professor at the department of laser physics and spectroscopy, faculty of physics.

voropay@bsu.by

Liudmila S. Lyashenko, PhD (physics and mathematics), docent; associate professor at the department of laser physics and spectroscopy, faculty of physics.

lyashenko@bsu.by

Peter T. Petrov, PhD (chemistry); head of the department of pharmacology and pharmacy.

petr_petrov@tut.by

Vladimir M. Nasek, PhD (medicine); head of the laboratory of toxicology.

labtox@yandex.by

Aliaksandr O. Savin, researcher at the laboratory of toxicology.

labtox@yandex.by

Raman D. Zilberman, researcher at the laboratory of toxicology.

labtox@yandex.by

на 780 нм. Установлено, что при воздействии квантами света с разной энергией на фотосенсибилизатор в клетках HeLa и при условии поглощения им одинакового количества фотонов в единицу времени доля погибших раковых клеток для обоих случаев одинакова. В экспериментах на лабораторных животных *in vivo* для штамма опухолей (саркома M-1) показано, что при увеличении длины волны фотовоздействия с 740 до 780 нм и поддержании одинакового числа поглощенных квантов света в единицу времени в единице объема опухолей глубина их повреждения возрастает в 1,5 раза. Наблюдаемые изменения связаны как с различием в пропускании тканей *in vivo* при увеличении длины волны использованного светового излучения, так и с ростом локальной концентрации кислорода вследствие фотодиссоциации оксигемоглобина.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор; опухолевые ткани; фотодинамическая терапия; некроз; излучение лазера; светодиод; линзовый растр.

PHOTODYNAMIC THERAPY USING THE PHOTOSENSITIZER BASED ON TRICARBOCYANINE DYE WITH POLYETHYLENE GLYCOL ON A MODEL FOR TUMOR BEARING LABORATORY ANIMALS

M. P. SAMTSOV^a, D. S. TARASOV^a,
E. S. VOROPAY^b, L. S. LYASHENKO^b, P. T. PETROV^c,
V. M. NASEK^c, A. O. SAVIN^c, R. D. ZILBERMAN^c

^aA. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems, Belarusian State University,
7 Kurčatava Street, Minsk 220108, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^cInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Akademika V. F. Kupreviča Street, 2 building, Minsk 220141, Belarus

Corresponding author: D. S. Tarasov (dmitrij-tarasov@list.ru)

Comparative studies of the effectiveness of photodynamic therapy during the experiments *in vitro* and *in vivo* have been performed when using radiation of a semiconductor laser with the wavelength 740 nm and of a light-emitting diode with the wavelength 780 nm. It has been established that the percentage of dead cancer cells is the same when the photosensitizer in HeLa cells is subjected to the photoeffect of light quanta with different energies and when absorption of the identical numbers of photons per unit time by the photosensitizer is ensured. In the experiments with laboratory animals *in vivo* for a strain of M-1 sarcoma tumors it has been established that, due to an increase in the photoexposure wavelength from 740 to 780 nm and owing to the maintained the same numbers of absorbed light quanta per unit time per unit volume of the tumors, a depth of their damage increased by a factor of 1.5. The observed changes are associated both with the differences in the transmission of tissues *in vivo* as the wavelength of light radiation increases and with the growing local oxygen concentration due to the photodissociation of oxyhemoglobin.

Key words: photosensitizer; tumor tissues; photodynamic therapy; necrosis.

Введение

Эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей в первую очередь определяется применяемым фотосенсибилизатором [1–4], а также зависит от условий и характеристик аппаратных средств фотовоздействия [5]. Как правило, в качестве источника света используется лазерное излучение с длиной волны в области максимума полосы поглощения фотосенсибилизатора. Вместе с тем появились светодиоды, с помощью которых в опухолевых тканях можно обеспечивать сравнимую с лазерами плотность мощности излучения. Для поверхностных локализаций опухолей такие источники света обладают преимуществами по сравнению с лазерами в силу значительно меньшей стоимости. В то же время при разработке аппаратуры и регламента ее использования в клинической практике необходимо сопоставление эффективности процесса ФДТ для различных применяемых источников.

Объекты и методика эксперимента

Проведено сравнение влияния параметров лазерного и светодиодного источников света на эффективность фототерапии злокачественных опухолей у подопытных животных. Использовался полупроводниковый лазер с длиной волны излучения 740 нм и максимальной мощностью 1 Вт и светодиод с длиной волны в максимуме полосы испускания 780 нм и световой мощностью до 1 Вт. В качестве

фотосенсибилизатора применялся водорастворимый, обладающий высокой биосовместимостью индирикарбоцианиновый краситель [6; 7]. В экспериментах *in vivo* эффективность фотохимиотерапевтического действия красителя оценивалась по глубине некроза солидных опухолей лабораторных животных. При расчете эффективной поглощенной световой дозы учитывалось поглощение красителя в модельных средах, в частности в клетках HeLa. Для регистрации распределения интенсивности по сечению пучка излучения применялась камера компании *ORMINS* (Беларусь).

Исследования проводили на монослой опухолевых клеток HeLa (плоскоклеточный рак шейки матки человека), который выращен в питательной среде 199 с добавлением 10 % сыворотки крови телят и 100 мг/мл канамицина. По завершении фотооблучения флаконы выдерживали 20 ч в термостате при 37 °С в темноте. Затем монослой обрабатывали 0,02 % раствором Версена и проводили подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева. Долю живых клеток в опытных группах определяли по отношению к контролю. На каждую точку использовали по 3 флакона с клетками.

В качестве экспериментальных модельных систем *in vivo* использованы солидные перевиваемые опухоли белых беспородных крыс – саркома М-1 (Са М-1). Исследования проводили спустя 9–10 сут после перевивки Са М-1. В каждой контрольной и опытной группе было не менее 5 крыс. Для оценки глубины некрозов в опухолях через 24 ч после сеанса ФДТ крысам внутривенно вводился 0,6 % раствор синьки Эванса (1 мл/100 г массы тела животного). Затем через 2 ч животные были выведены из эксперимента с использованием общепринятых методов эвтаназии (хлороформ), опухоли иссечены, фиксированы в 10 % растворе формалина в течение 2 ч и заморожены. После этого сделаны гистолографические срезы опухолей (2 мм толщиной по диаметру опухоли) с последующей фиксацией их изображений с помощью фотокамеры.

Мощность падающего на образцы света определялась с помощью измерителя LM-2. Спектры поглощения регистрировались спектрофотометром PV 1251A фирмы *Solar* (Беларусь). Спектры флуоресценции красителя *in vivo* регистрировались с применением спектрометрического комплекса, разработанного в Институте прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко БГУ [8; 9]. Подвод возбуждающего излучения ($\lambda = 683$ нм) к образцу и сбор света флуоресценции в спектрометрическом комплексе осуществлялись посредством световода.

Результаты и их обсуждение

Сравнение эффективности фотохимиотерапии при использовании источников света с различным спектральным составом следует проводить с учетом того, что степень повреждения клеток в значительной мере зависит от плотности мощности падающего света [10–13]. Следует учитывать, что в основе ФДТ лежат фотохимические реакции, скорость протекания которых зависит как от свойств фотосенсибилизатора, параметров светового излучения, так и от наличия в среде кислорода [14]. Последнее обстоятельство связано с потреблением кислорода во время сеанса ФДТ, что приводит к значительному уменьшению уровня оксигенации опухолевых тканей при использовании достаточно высокой плотности мощности светового потока и, соответственно, уменьшению эффективности их повреждения [14; 15]. Поэтому фотоповреждение опухолевых клеток при световом воздействии излучением с длиной волны 740 и 780 нм необходимо проводить при выполнении ряда условий.

Для создания одинаковой скорости расхода кислорода и красителя в процессе фотовоздействия для каждой из использованных длин волн излучения обеспечивалось одинаковое количество поглощенных фотосенсибилизатором квантов света в единицу времени в биологических структурах. Это достигалось путем выбора плотности мощности падающего на образец света для каждой длины волны. Соотношение этих величин определялось путем анализа спектра пропускания T полиметинового красителя в клетках HeLa (рис. 1), так как величина $(1 - T)$ пропорциональна количеству поглощенных фотосенсибилизатором фотонов. Поэтому для обеспечения условия поглощения фотосенсибилизатором одинакового количества квантов света в единицу времени при использовании для фотовоздействия света разных источников (с длиной волны 740 или 780 нм) отношение плотности мощности одного источника света к плотности мощности другого выбиралось равным обратной величине соотношения значений $(1 - T)$ для двух соответствующих длин волн. Установлено, что для обеспечения одинакового числа поглощенных фотосенсибилизатором квантов света в единицу времени для указанных источников плотность мощности излучения на 780 нм должна быть больше в 2,3 раза по сравнению с излучением на 740 нм (с учетом различий энергии фотонов для использованных источников света).

Фотовоздействие осуществлялось в течение одинакового времени для каждого источника света. Основанием для использования спектра поглощения красителя в клетках HeLa при определении коэффициента для фотовоздействия в тканях *in vivo* является то, что спектры флуоресценции фотосенсибилизатора в клеточной культуре HeLa и в тканях *in vivo* совпадают по положению и форме (см. рис. 1).

При этом следует учитывать, что в спектральном диапазоне, соответствующем полосе флуоресценции исследованного красителя, коэффициент рассеяния биотканей принимает практически постоянное значение [16], следовательно, не может оказывать существенного влияния на положение и форму его спектра.

В то же время значительное влияние на спектрально-люминесцентные характеристики исследованного класса соединений оказывает полярность среды [11]. Поэтому наблюдаемое совпадение спектров флуоресценции фотосенсибилизатора *in vivo* и *in vitro*, обусловленное одинаковым микроокружением молекул в этих системах, дает основание предположить идентичность в них и спектров поглощения.

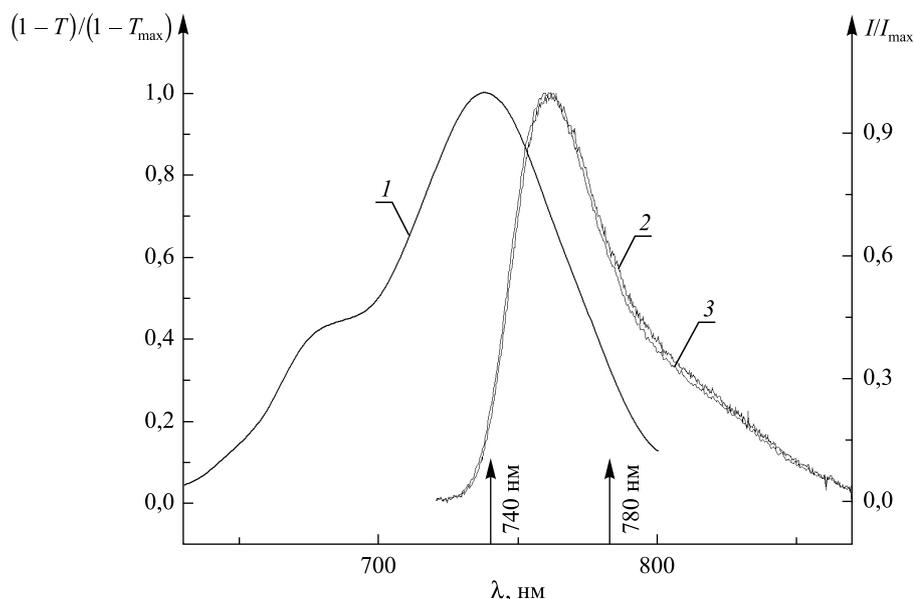
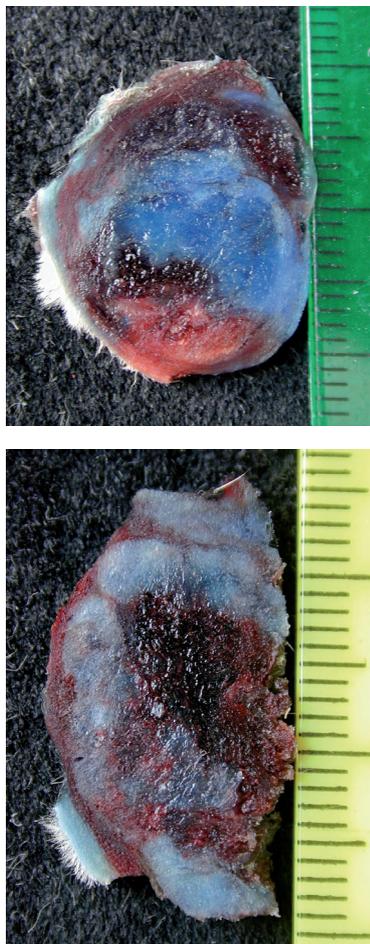


Рис. 1. Спектр поглощения (1) и флуоресценции (2, 3) фотосенсибилизатора в клетках HeLa (1, 3), *in vivo* с учетом влияния поглощения биоткани (2)
Fig. 1. Absorption (1) and fluorescence (2, 3) spectrum of the photosensitizer in cells HeLa (1, 3), *in vivo* in view of impact absorption biological tissue (2)

В результате проведения экспериментальных исследований *in vitro* установлено, что при указанных условиях фотовоздействия доля погибших клеток HeLa для обоих использованных источников света практически одинакова. Оптическая плотность суспензии клеток HeLa, содержащей порядка $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 cm^3 , не превышает $D < 0,006$ в спектральном диапазоне 600–900 нм, т. е. без фотосенсибилизатора в клетках практически отсутствует поглощение. При этом клеточная культура оказалась средой, в которой пропускание в спектральной области источников света (740 и 780 нм) имеет одинаковое значение. Следовательно, для прозрачной биологической среды отсутствуют какие-либо различия в активности фотосенсибилизатора при воздействии излучением в пределах основной полосы его поглощения. В сеансах фотохимиотерапии на перевиваемых опухолях экспериментальных животных использовалось такое же соотношение величин плотности мощности падающего излучения при применении этих же источников света. Установлено, что средняя глубина повреждения перевиваемых опухолей Ca M-1 крыс при воздействии светом с длиной волны 780 нм в 1,5 раза больше по сравнению с воздействием излучением с длиной волны 740 нм, т. е. при фотовоздействии в указанном спектральном диапазоне наблюдается рост глубины повреждения опухолевых тканей с увеличением длины волны использованного источника излучения. Коэффициенты поглощения биоткани на длинах волн 780 и 740 нм имеют достаточно близкие значения [17–19], вместе с тем наблюдаются существенные (до полутора раз) различия в глубине некроза при фотовоздействии источниками света с длинами волн 780 и 740 нм.

Проведено исследование влияния однородности пучка падающего на образец света по сечению пучка на степень и эффективность повреждения опухолевых тканей в результате ФДТ. Для этого с помощью камеры (ORMINS) регистрировалось распределение интенсивности излучения по сечению пучка на разных расстояниях от лазера. Оказалось, что распределение излучения по сечению светового пучка полупроводникового лазера ($\lambda = 740 \text{ nm}$) является в значительной степени неоднородным (рис. 2, а), в различных точках сечения освещенность различалась на 1–2 порядка. Отклонение огибающей от средней по 10 точкам достигало 55 %, среднее квадратичное отклонение составляло 18 %. Такая высокая неоднородность лазерного пучка может привести к неравномерному фотовоздействию во время сеанса ФДТ и, как следствие, – к фрагментарному повреждению опухоли.

a/a



b/b

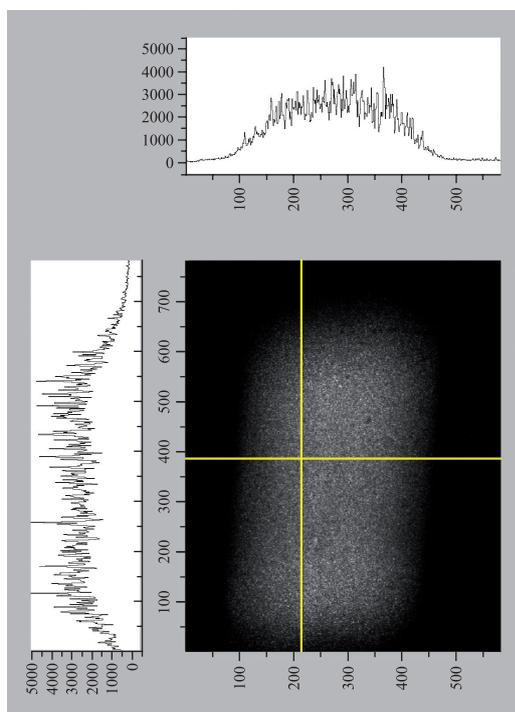
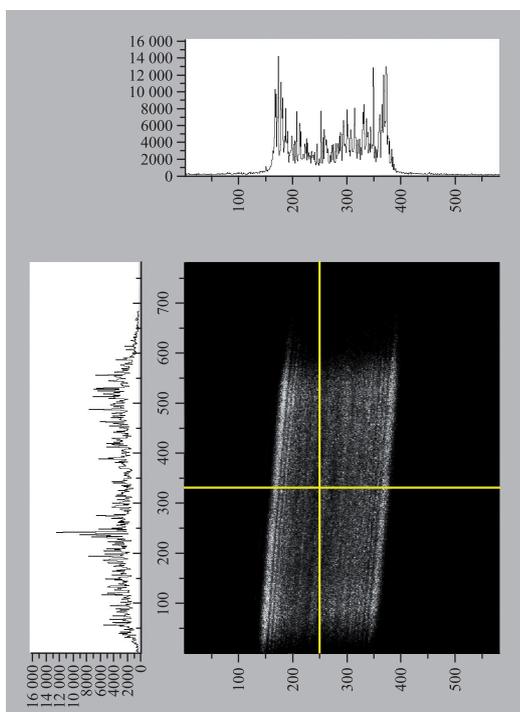
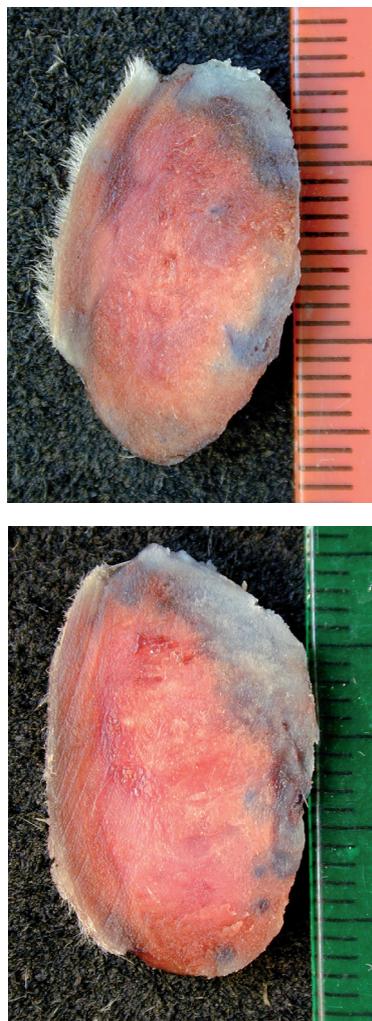


Рис. 2. Распределение интенсивности на экране излучения полупроводникового лазера с длиной волны 740 нм и соответствующие некрозы опухолей *in vivo*:
a – без рассеивателя; *b* – с аperiодическим линзовым растром

Fig. 2. Intensity distribution over the beam section of the semiconductor laser radiation with a wavelength of 740 nm and the corresponding necrosis of tumors *in vivo*:
a – without a scatterer; *b* – with an aperiodic lenticular raster

Для повышения однородности на выходе из лазера устанавливался рассеиватель излучения. Наиболее эффективным оказался аперидический линзовый растр. Растровые компоненты, как правило, используются для получения требуемого распределения света и равномерного освещения объектов в системах лазерной обработки, осветительном оборудовании, микроскопах, медтехнике, в качестве проекционных экранов в устройствах визуального наблюдения [20; 21]. Снимки поверхности рассеивателя, сделанные при использовании микрообъективов с 10-кратным увеличением, приведены на рис. 3. Поверхность такого рассеивателя представляет собой массив из плоско-выпуклых собирающих линз неправильной формы. Размер линз варьируется в интервале 20–160 мкм, за счет чего достигается выравнивание освещенности по сечению пучка и на поверхности образца. При этом светораспределение в силу высокой контрастности освещающих пучков имеет вид, подобный светораспределению в спектре Фраунгофера дифракционной решетки, сглаженный за счет конечных размеров источника света. Огибающая светораспределения в идеальном случае должна иметь вид трапеции.

Использование линзового растра позволило уменьшить перепады интенсивности соседних точек в сечении пучка более чем в 5 раз, т. е. существенно снизить разброс интенсивности по сечению. Так, отношение интенсивности наиболее освещенных областей к интенсивности наименее освещенных не превышало 1,6, отклонение огибающей от средней не превосходило 27 %, а среднее квадратичное отклонение уменьшилось до 8 %.

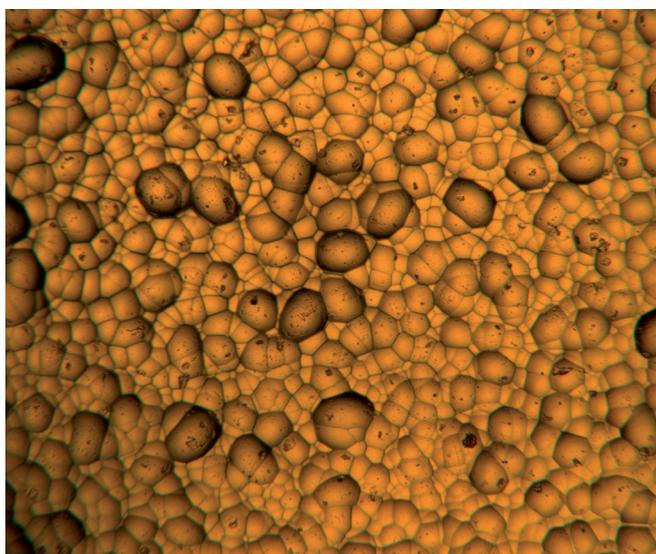


Рис. 3. Поверхность аперидического линзового растра при 10-кратном увеличении

Fig. 3. Image of the aperiodic lens raster surface at tenfold magnification

При применении такого рассеивателя результативность сеансов фотохимиотерапевтического воздействия заметно улучшилась. Так, в случае одинаковой экспозиционной дозы света 200 Дж/см² и средней плотности мощности 150 мВт/см² при проведении сеанса ФДТ с использованием лазера с установленным рассеивателем получены некрозы с глубиной повреждения до 2 см, а без рассеивателя – только 5 мм (рис. 2, б).

Используемый в работе светодиодный источник без дополнительных оптических устройств обладает относительно однородным распределением излучения по сечению пучка. Установка аперидического линзового растра на выходе светодиодного источника снизила отклонение от огибающей, при этом профиль излучения имеет достаточно гладкую колоколообразную форму (рис. 4).

В результате проведения сеанса фотохимиотерапии с такой же, как для лазера ($\lambda = 780$ нм), эффективной экспозиционной дозой света 200 Дж/см² и средней плотностью мощности 150 мВт/см² по всей площади засветки опухолевых узлов некрозы тканей были сплошными, площадь некроза опухолей составила 76–89 % (см. рис. 4).

Наиболее значительным фактором повышения эффективности повреждения опухолевых тканей с увеличением длины волны фотовоздействия представляется увеличение выхода в ткани свободного кислорода вследствие фотодиссоциации молекул оксигемоглобина крови [22]. При выполнении условия поглощения фотосенсибилизатором в единичном объеме опухоли одинакового числа фотонов в единицу времени для источника света с длиной волны 780 нм реально падающая доза света была выше, чем для 740 нм. Это

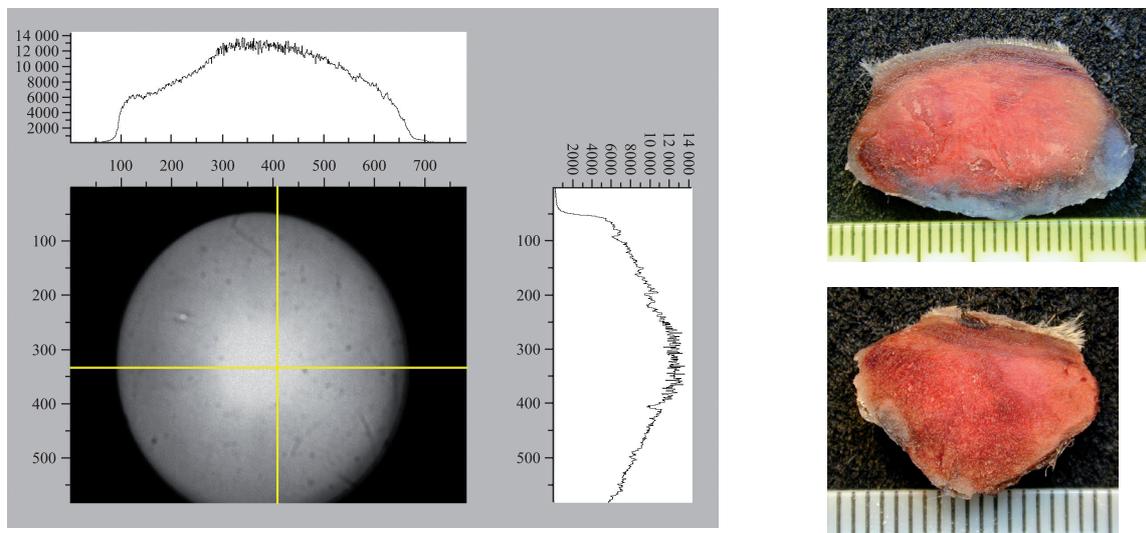


Рис. 4. Распределение интенсивности на экране излучения полупроводникового светодиода с длиной волны 780 нм и соответствующие некрозы опухолей *in vivo*

Fig. 4. The intensity distribution on the screen of the semiconductor LED radiation with a wavelength of 780 nm and the corresponding tumor necrosis *in vivo*

вызывает нагрев тканей и приводит к увеличению скорости кровотока, что способствует более быстрому подходу новых порций сенсibilизатора к облучаемому участку опухоли и может повлиять на величину повреждения. Таким образом, все указанные факторы повышают эффективность ФДТ.

Заклучение

На основании проведенных сравнительных исследований эффективности ФДТ при использовании для облучения полупроводникового лазера с длиной волны 740 нм и светодиода с длиной волны в максимуме излучения 780 нм установлено, что, несмотря на близкие по величине коэффициенты пропускания биоткани на указанных длинах волн, глубина некроза для светодиодного источника примерно в 1,5 раза больше. Предполагается, что различия в глубине повреждения опухолей при фотовоздействии источниками с разной длиной волны света определяются не только отличиями в пропускании тканей, но и возможной неодинаковой эффективностью фотодиссоциации молекул гемоглобина в кровеносных сосудах.

Библиографические ссылки

1. Ericson MB, Wennberg AM, Larkö O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Therapeutics and clinical risk management*. 2008;4(1):1–9. DOI: 10.2147/TCRM.S1769.
2. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(12):889–905. DOI: 10.1093/jnci/90.12.889.
3. Oniszczyk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT) – Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;83:912–929. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.058.
4. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. 2016;473(4):347–364. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.058.
5. Странадко ЕФ, Армичев АВ, Гейниц АВ. Источники света для фотодинамической терапии. *Лазерная медицина*. 2011; 15(3):63–69.
6. Самцов МП (Беларусь), Луговский АП (Беларусь), Воропай ЕС (Беларусь), Петров ПТ (Беларусь), Луговский АА (Беларусь), Демид ДИ (Беларусь), Истомин ЮП (Беларусь), авторы; Белорусский государственный университет, научно-исследовательское учреждение «Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко» БГУ, правообладатели. Водорастворимый индотрикарбацианиновый краситель в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии злокачественных опухолей. Республика Беларусь 17638. 30 июля 2012.
7. Lugovski A, Samtsov M, Kaplevsky K, Petrov P, Voropay E, Tarasau D, et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*. 2016;316:31–36. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.008.
8. Самцов МП, Радько АЕ, Каплевский КН, Шевченко КА. Лазерный спектрометрический комплекс для флуоресцентной диагностики области локализации опухолей. В: *Квантовая электроника. Материалы V Международной научно-технической конференции; 22–25 ноября 2004 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2004. с. 20–24.
9. Ермалицкий ФА, Радько АЕ, Каплевский КН, Шевченко КА. Спектрометрический комплекс для фотохимиотерапии с мощным светодиодом [Интернет]. Минск: Академия управления при Президенте Республики Беларусь; 2008 [цитировано 21 июля 2017]. Доступно по: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/29842>.
10. Самцов МП, Воропай ЕС, Каплевский КН, Мельников ДГ, Ляшенко ЛС, Истомин ЮП. Влияние энергии фотона на эффективность фотохимиотерапии. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2009;76(4):576–582. DOI: 10.1007/s10812-009-9223-x.
11. Воропай ЕС, Самцов МП, Каплевский КН, Мельников ДГ, Ляшенко ЛС. Фотодинамическая лазерная терапия и диагностика областей локализации на основе новых типов фотосенсибилизаторов. *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. 2007;71(1):145–149.

12. Coutier S, Mitra S, Bezdetnaya L, Parache RM, Georgakoudi I, Foster TH, et al. Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in Meta-Tetra-(hydroxyphenyl) chlorin – photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids. *Photochemistry and photobiology*. 2001;73(3):297–303. DOI: 10.1562/0031-8655(2001)073<0297:EOFROC>2.0.CO;2.
13. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(6):443–456. DOI: 10.1093/jnci/85.6.443.
14. Странадко ЕФ. Механизмы действия фотодинамической терапии. *Российский онкологический журнал*. 2000;4:52–56.
15. Hasan T, Ortel B, Moor ACE, Pogue BW. Photodynamic therapy of cancer. *Cancer Medicine*. 1997;50:739–751.
16. Matcher SJ, Elwell CE, Cooper CE, Cope M, Delpy DT. Performance comparison of several published tissue near-infrared spectroscopy algorithms. *Analytical biochemistry*. 1995;227(1):54–68. DOI: 10.1006/abio.1995.1252.
17. Taroni P, Pifferi A, Torricelli A, Comellia D, Cubeddua R. *In vivo* absorption and scattering spectroscopy of biological tissues. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2003;2(2):124–129. DOI: 10.1039/B209651J.
18. Loschenov VB, Konov VI, Prokhorov AM. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. *Laser physics*. 2000;10(6):1188–1207.
19. Ballangrud AM, Barajas O, Georgousis A, Miller GG, Moore RB, McPhee MS, et al. *In vivo* light transmission spectra in EMT6/Ed murine tumors and Dunning R3327 rat prostate tumors during photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1997;21(2):124–133. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9101(1997)21:2<124::AID-LSM3>3.0.CO;2-S.
20. Жидкова НА, Калинина ОД, Кучин АА, Натаровский СН, Немкова ОН, Скобелева НБ. Использование линзовых растров в осветителях микроскопов отраженного света. *Оптико-механическая промышленность*. 1988;8:23–24.
21. Шредер Г, Трайбер Х. *Техническая оптика*. Москва: Техносфера; 2006. 424 с.
22. Асимов ММ, Асимов РМ, Рубинов АН. Спектр действия лазерного излучения на гемоглобин кровеносных сосудов кожи. *Журнал прикладной спектроскопии*. 1998;65(6):878–880. DOI: 10.1007/BF02675749.

References

1. Ericson MB, Wennberg AM, Larkö O. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Therapeutics and clinical risk management*. 2008;4(1):1–9. DOI: 10.2147/TCRM.S1769.
2. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(12):889–905. DOI: 10.1093/jnci/90.12.889.
3. Oniszczuk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczuk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT) – Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;83:912–929. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.058.
4. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. 2016;473(4):347–364. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.058.
5. Stranadko EPh, Arnichev AV, Geynits AV. Light sources for photodynamic therapy. *Laser medicine*. 2011;15(3):63–69. Russian.
6. Samtsov MP (BY), Lugovskii AP (BY), Voropai ES (BY), Petrov PT (BY), Lugovskii AA (BY), Demid DI (BY), Istomin YuP (BY), authors; Belarusian State University, nauchno-issledovatel'skoe uchrezhdenie «A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems, Belarusian State University, assignee. Water-soluble indotricarbocyanine dye as a photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumors. Republic of Belarus 17638. 2012 July 30. Russian.
7. Lugovski A, Samtsov M, Kaplevsky K, Petrov P, Voropay E, Tarasau D, et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*. 2016;316:31–36. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.008.
8. Samtsov MP, Rad'ko AE, Kaplevskii KN, Shevchenko KA. [Laser spectrometry complex for fluorescent diagnosis of the tumor localization area]. In: *Kvantovaya elektronika. Materialy V Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii; 22–25 noyabrya 2004 g.; Minsk, Belarus'* [Quantum electronics. Proceedings of the V International scientific conference; 2004 November 22–25; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2004. p. 20–24. Russian.
9. Ermalitskii FA, Rad'ko AE, Kaplevskii KN, Shevchenko KA. [Spectrometric complex for photochemotherapy with a powerful LED] [Internet]. Minsk: Academy of Public Administration under the aegis of the President of the Republic of Belarus; 2008 [cited 2017 July 21]. Available from: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/29842>. Russian.
10. Samtsov MP, Voropay ES, Kaplevsky KN, Melnikau DG, Lyashenko LS, Istomin YuP. Influence of photon energy on the efficiency of photochemotherapy. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2009;76(4):576–582. DOI: 10.1007/s10812-009-9223-x. Russian.
11. Voropai ES, Samtsov MP, Kaplevskii KN, Mel'nikov DG, Lyashenko LS. Photodynamic laser therapy and diagnosis of localization areas based on new types of photosensitizers. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya fizicheskaya*. 2007;71(1):145–149. Russian.
12. Coutier S, Mitra S, Bezdetnaya L, Parache RM, Georgakoudi I, Foster TH, et al. Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in Meta-Tetra-(hydroxyphenyl) chlorin – photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids. *Photochemistry and photobiology*. 2001;73(3):297–303. DOI: 10.1562/0031-8655(2001)073<0297:EOFROC>2.0.CO;2.
13. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(6):443–456. DOI: 10.1093/jnci/85.6.443.
14. Stranadko EF. Mechanism of photodynamic action. *Russian Journal of Oncology*. 2000;4:52–56. Russian.
15. Hasan T, Ortel B, Moor ACE, Pogue BW. Photodynamic therapy of cancer. *Cancer Medicine*. 1997;50:739–751.
16. Matcher SJ, Elwell CE, Cooper CE, Cope M, Delpy DT. Performance comparison of several published tissue near-infrared spectroscopy algorithms. *Analytical biochemistry*. 1995;227(1):54–68. DOI: 10.1006/abio.1995.1252.
17. Taroni P, Pifferi A, Torricelli A, Comellia D, Cubeddua R. *In vivo* absorption and scattering spectroscopy of biological tissues. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2003;2(2):124–129. DOI: 10.1039/B209651J.
18. Loschenov VB, Konov VI, Prokhorov AM. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. *Laser physics*. 2000;10(6):1188–1207.
19. Ballangrud AM, Barajas O, Georgousis A, Miller GG, Moore RB, McPhee MS, et al. *In vivo* light transmission spectra in EMT6/Ed murine tumors and Dunning R3327 rat prostate tumors during photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1997;21(2):124–133. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9101(1997)21:2<124::AID-LSM3>3.0.CO;2-S.
20. Zhidkova NA, Kalinina OD, Kuchin AA, Natarovskii SN, Nemkova ON, Skobeleva NB. [Application of lens raster illuminators reflected light microscopes]. *Optiko-mekhanicheskaya promyshlennost'*. 1988;8:23–24. Russian.
21. Shreder G, Traiber Kh. *Tekhnicheskaya optika* [Technical optics]. Moscow: Tekhnosfera; 2006. 424 p. Russian.
22. Asimov MM, Asimov RM, Rubinov AN. Spectrum of the effect of laser radiation on hemoglobin of the blood vessels of skin. *Journal of Applied Spectroscopy*. 1998;65(6):878–880. DOI: 10.1007/BF02675749. Russian.