

Матрицы возбуждения-испускания и синхронная флуоресцентная спектроскопия для диагностики рака желудочно-кишечного тракта*

Ц.Генова, Е.Борисова, Н.Пенков, Б.Владимиров, Ал.Желяжкова, Л.Аврамов

Разработана усовершенствованная флуоресцентная диагностическая методика для обнаружения рака в желудочно-кишечном тракте. Исследована флуоресценция образцов ткани толстого кишечника ex vivo при наличии и при отсутствии рака с применением стационарных подходов, основанных на использовании матриц возбуждения-испускания и синхронной флуоресцентной спектроскопии (СФС). Полученные результаты обработаны с целью выявления характерных особенностей в спектре флуоресценции, имеющих диагностическую значимость. Основными флуорофорами ткани, ответственными за наблюдаемую флуоресценцию, являются тирозин, триптофан, NADH, FAD, коллаген и эластин. На основе результатов теста Манна–Уитни в качестве параметров, используемых для дифференциации желудочно-кишечного рака и нормальной слизистой оболочки, предложены длины волн возбуждения в диапазоне 300–360 нм для флуоресцентной спектроскопии и интервалы между длинами волн возбуждения и испускания 60 и 90 нм для СФС.

Ключевые слова: матрица возбуждения-испускания, синхронная флуоресцентная спектроскопия, оптическая биопсия, колоректальный рак.

1. Введение

Колоректальный рак – одна из наиболее частых причин смертности в мире [1]. Частота случаев колоректального рака увеличивается [1], поэтому его точная диагностика и эффективное лечение являются задачами первостепенной важности для здравоохранения. Внедрение более частого скрининга снизило число смертельных исходов, но для дальнейшего его уменьшения необходимо совершенствование методов диагностики [2]. Точность современного стандартного диагностического обследования полностью зависит от опыта врача и ограничена высокой вероятностью ошибок, а также строгими протоколами биопсии – дорогостоящей и требующей большого времени процедуры [3]. Потенциальные возможности методов оптической биомедицинской диагностики, используемых для детального неинвазивного или минимально инвазивного анализа многокомпонентных сред, таких как биологические ткани, интенсивно изучаются с целью применения в новых средствах клинической диагностики для дифференциации раковых и нормальных тканей с высокими чувствительностью и точностью [4].

Одним из наиболее интенсивно исследуемых оптических методов эндоскопической желудочно-кишечной диагностики является флуоресцентная спектроскопия [5–9]. Изменения ткани, пораженной раком, влияют на распространение света, поглощающие свойства и содержание

флуорофоров в ткани, к которым чувствительна флуоресцентная спектроскопия. Интенсивность флуоресценции, форма ее спектра и затухание во времени для таких эндогенных флуорофоров, как триптофан, тирозин, коллаген, эластин, никотинамидадениндинуклеотид (NADH) и флавинадениндинуклеотид (FAD), имеют диагностическое значение [10], понимание и оценка которого необходимы для успешного внедрения автофлуоресцентной диагностики в клиническую практику.

Эффективность автофлуоресцентного имиджинга (АФИ) при обнаружении раковых тканей желудочно-кишечного тракта реализована в промышленных системах для эндоскопической диагностики [9, 11, 12]. Однако еще имеется большой простор для улучшения этой методики, т. к. относительно низкая селективность и плохое разрешение изображений приводят к высокой частоте ложных обнаружений и мешают АФИ стать удобным инструментом в клинической практике [5, 13, 14]. Оптимизация доступных эндоскопических АФИ-систем направлена главным образом на снижение шума, повышение цветового контраста и определение устойчивых параметров и алгоритмов [12, 14, 15].

В стандартной спектроскопии флуоресценции матрицы возбуждения-испускания (МВИ) используются для получения картины флуоресценции в широком спектральном диапазоне. Эта трехмерная флуоресцентная спектроскопия одновременно дает информацию о длине волны возбуждения, а также о длине волны и об интенсивности наблюдаемой флуоресценции. Данный метод позволяет определить длины волн возбуждения, вызывающего флуоресценцию, спектр которой содержит наиболее ценные сведения для клинического диагностического анализа, и выявить основные эндогенные флуорофоры в исследуемой ткани [16].

Сравнительно новым подходом во флуоресцентных исследованиях биологических тканей является синхронная флуоресцентная спектроскопия (СФС). Основы ее

* Перевод с англ. В.Л.Дербова.

Ts.Genova, E.Borisova, Al.Zhelyazkova, L.Avramov. Institute of Electronics, Bulgarian Academy of Sciences, 72, Tsarigradsko chaussee Blvd., 1784 Sofia, Bulgaria; e-mail: borisova@ie.bas.bg
N.Penkov, B.Vladimirov. University Hospital «Tsaritsa Yoanna-ISUL», 8, Byalo more str., 1527 Sofia, Bulgaria

теории и возможные применения представлены в работе [17]. Использование СФС в биомедицинских исследованиях впервые описано в работе [18]. Метод СФС основан на одновременном сканировании длин волн возбуждения и испускания, между которыми сохраняется постоянный интервал. В результате в детектируемом спектре для выбранного интервала длин волн значимые спектральные особенности исследуемого образца намного более выражены и спектрально разрешимы благодаря отсутствию спектрального перекрытия. Метод обладает большей чувствительностью и, в особенности, большей селективностью, и поэтому перспективен для улучшения ныне существующей техники АФИ [19].

СФС как средство дифференциации тканей и анализа биожидкостей применялась для диагностики рака молочной железы, шейки матки и щитовидной железы, где метод показал себя вполне конкурентоспособным и перспективным для внедрения в клиническую диагностическую практику [18–25]. Однако мы не нашли сведений о детальных исследованиях по применению СФС для autofluorescentного обнаружения колоректального рака.

Цель настоящей работы состояла в оценке потенциальных возможностей СФС для обнаружения колоректального рака и в определении подходящих диагностических признаков для получения надежного диагностического параметра.

2. Материалы и методы

Исследуемые образцы иссекались в ходе стандартной клинической процедуры удаления злокачественных опухолей, осуществляемой в клинике университета «Царица Иоанна – ISUL» (София). Все пациенты получили письменную информацию и подписали согласие на исследование, одобренное этическим комитетом клиники. Образцы тканей хранились в модифицированном растворе Кребса (NaCl , KCl , CaCl_2 , глюкоза, таурин, HEPES , пировиноградная кислота) в изотермических условиях и транспортировались с возможной быстротой в лабораторию «Биофотоника» Института электроники. Флуоресценция раствора, в котором хранились образцы, оценивалась как пренебрежимо слабая по сравнению с флуоресценцией исследуемой ткани. Форма и размеры образцов варьировались в зависимости от размера и типа иссекаемой опухоли, однако их толщина не превышала 7 мм.

Для измерений использовался спектрофлуориметр FluoroLog 3 (HORIBA Jobin Yvon, Франция). Источником света служила ксеноновая лампа мощностью 300 Вт, длины волн возбуждения и испускания определялись с помощью двух двойных монохроматоров, а детектором служил фотоумножитель. Поскольку образцы имели различную форму и размеры, их флуоресценция исследовалась с помощью дополнительного волоконно-оптического модуля Fluorolog 3 – F-3000, который позволяет проводить измерения вне камеры, содержащей образцы. Во время экспериментов волокно используемого волоконно-оптического модуля располагалось перпендикулярно образцу, и торец волокна соприкоснулся с тканью, поэтому освещаемая поверхность образца соответствует поверхности торца оптоволоконного зонда.

Мы проводили исследования флуоресценции с применением МВИ при длинах волн возбуждения в диапазоне 280–440 нм с шагом 10 нм. Флуоресценция регистрировалась в диапазоне 300–800 нм с шагом сканирования

1 нм. Накопление данных для МВИ занимает приблизительно 27 мин.

Второй используемый нами подход – сравнительная СФС раковых и нормальных образцов. В наших исследованиях синхронная регистрация флуоресценции осуществлялась при ее возбуждении в спектральном диапазоне 280–720 нм с интервалами $\Delta\lambda$ между длинами волн возбуждения и испускания в диапазоне 10–280 нм с шагом 10 нм. Один скан СФС занимает около 2 мин, а поскольку интервал между длинами волн меняется вручную и принимает 28 значений, время сбора данных для одного скана всей СФС-матрицы составляет около 60 мин.

Спектроскопические измерения проводились по точкам для раковой и здоровой частей каждого из 14 образцов пораженной колоректальным раком ткани, взятых у 11 больных с одинаковым гистопатологическим диагнозом (три образца ткани были взяты у одного больного и еще два – у другого больного). В эксперименте для каждого образца ткани от точки к точке контролировались изменения сигнала по интенсивности и форме полос флуоресценции. Авторы связывают эти изменения с визуально наблюдаемым повышенным содержанием крови или с тонкими морщинами, покрывающими кожу. Для каждого образца измерения выполнялись в трех-пяти точках.

При СФС-детектировании проводилась коррекция регистрируемого сигнала на интенсивность лампы, предусмотренная в стандартном математическом обеспечении используемого спектрофлуориметра.

3. Результаты и их обсуждение

На рис. 1,а показана МВИ нормальной слизистой оболочки толстой кишки, а на рис. 1,б – МВИ раковой ткани. Для лучшего сравнения МВИ в обоих случаях использовалась одна и та же шкала интенсивности. Чтобы оценить, насколько СФС подходит для дифференциации тканей, представим ее результаты в трехмерной графической форме, где по двум осям отложены длина волны возбуждения и интервал длин волн $\Delta\lambda$, поддерживаемый в течение скана. Цветная карта равной интенсивности представляет интенсивность наблюдаемой флуоресценции (рис. 2).

Из полученных спектральных данных путем сравнения параметров максимумов интенсивности в координатах λ_{ex} , λ_{em} и λ_{ex} , $\Delta\lambda$ с данными по флуоресцентным характеристикам главных эндогенных флуорофоров из работы [26] мы можем определить несколько эндогенных флуорофоров как главных источников флуоресценции исследуемых тканей, а именно: аминокислоты тирозин и триптофан, коферменты NADH и FAD и структурные белки коллаген и эластин, а также их шивки. Основные спектральные характеристики этих флуорофоров представлены в табл. 1.

Главные различия спектров флуоресценции здоровых и раковых тканей заключаются в уровнях интенсивности флуоресценции аминокислот тирозина и триптофана, ферментов и коферментов NADH и FAD , а также структурных белков эластина и коллагена. Наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции аминокислот тирозина и триптофана является следствием интенсивного производства белков, построенных из аминокислот, из-за ускоренного метаболизма раковых клеток [27]. Одна из функций кофермента NADH состоит в переносе электрона в процессе клеточного дыхания, изменяющегося в раковых клетках [28, 29], что может быть одной из причин

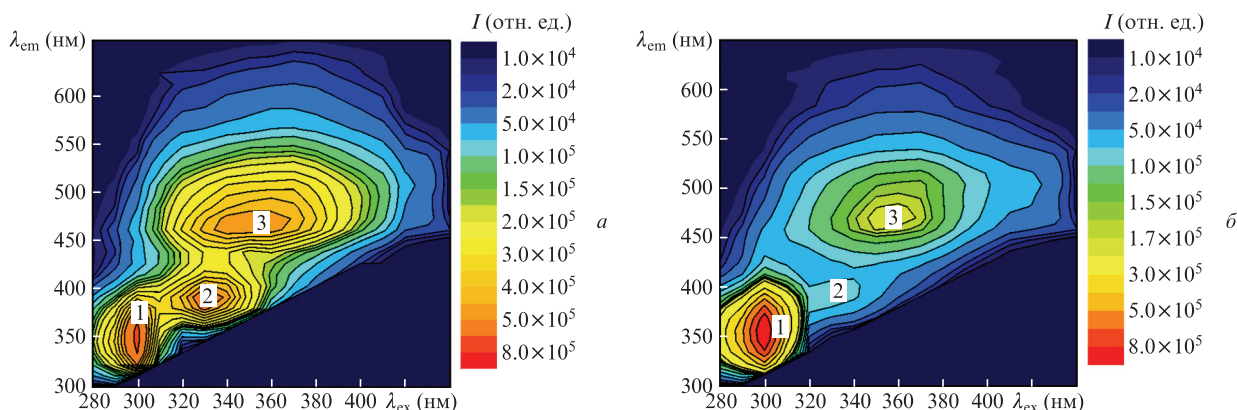


Рис.1. МВИ нормальной слизистой оболочки (а) и карциномы (б) толстой кишки. Островки интенсивной флуоресценции отнесены к аминокислотам тирозину и триптофану (1), структурным белкам коллагену и эластину (2), коферментам FAD и NADH (3); I – интенсивность флуоресценции, λ_{ex} и λ_{em} – длины волн возбуждения и испускания соответственно. Цветной вариант рис.1 помещен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

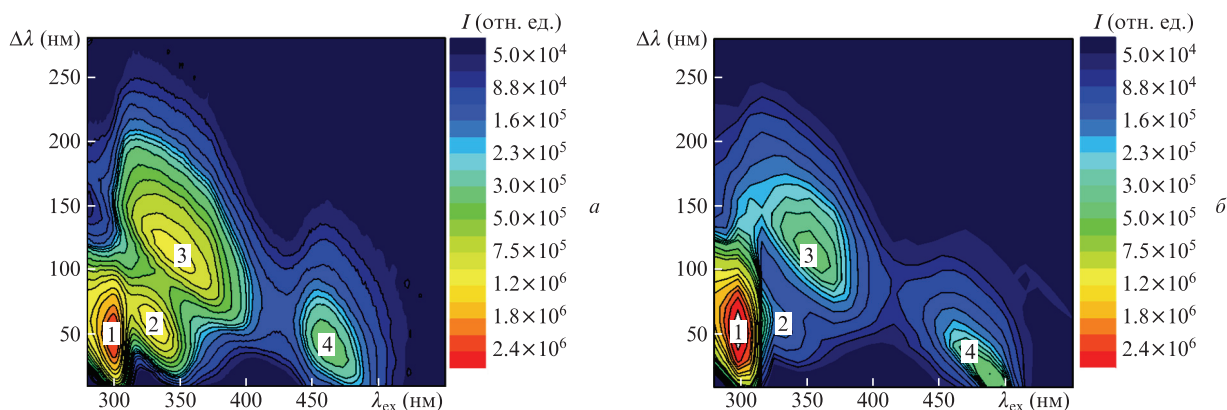


Рис.2. СФС-карты здоровой (а) и пораженной раком (б) слизистой оболочки толстой кишки. Островки интенсивной флуоресценции отнесены к аминокислотам тирозину и триптофану (1), структурным белкам коллагену и эластину (2), коферментам NADH (3) и FAD (4). Цветной вариант рис.2 помещен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

наблюдаемого уменьшения максимумов интенсивности флуоресценции NADH раковых тканей. Другими флуорофорами, интенсивность флуоресценции которых снижается в раковых клетках, являются структурные белки коллаген и эластин. Наиболее правдоподобная причина этого снижения – аномальный рост размеров раковых клеток, вызывающий разрыв внеклеточного матрикса, образованного структурными белками и их сшивками [30].

Более высокая чувствительность и уменьшенное спектральное перекрытие, характерные для СФС, позволяют выявить больше деталей трехмерного спектра исследованных тканей. Из сравнения рис.1,а и 2,а, а также рис.1,б и 2,б видно, что в режиме СФС имеется больше спектральных подробностей и лучше проявляются островки интен-

сивной флуоресценции, коррелирующие с данным типом эндогенного флуорофора. Методика СФС позволила нам наблюдать характерные максимумы флуоресценции коллагена при возбуждении на $\lambda_{ex} = 350$ нм и испускании на $\lambda_{em} = 400$ нм, интенсивность которых для раковых клеток меньше, чем для здоровых. В СФС-спектрах видны два отдельных максимума флуоресценции FAD и NADH, которые наблюдаются как один общий широкий максимум на картах МВИ.

СФС-флуоресценция лучше выражена для того из присутствующих флуорофоров, для которого используемый интервал между длинами волн возбуждения и испускания совпадает с разностью длин волн максимумов поглощения и испускания. Выбирая этот интервал вблизи разности длин волн максимумов поглощения и испускания главных обнаруженных эндогенных флуорофоров, мы получаем СФС-спектры здоровой и раковой ткани с наиболее выраженными различиями.

СФС-спектры для 14 образцов нормировались так, чтобы площадь под каждой кривой равнялась единице. Это исключает различия между пациентами или разными образцами от одного пациента [31]. Полученные в результате усреднения нормированные СФС-спектры нормальной и раковой ткани для $\Delta\lambda = 60$ и 90 нм представлены на рис.3. Максимумы СФС-флуоресценции при $\Delta\lambda = 60$ нм обусловлены аминокислотами тирозином и триптофаном, а также структурными белками коллагеном и эла-

Табл.1. Спектральные характеристики главных эндогенных флуорофоров, наблюдаемых в исследованных тканях желудочно-кишечного тракта.

Эндогенный флуорофор	Длина волны максимума возбуждения (нм)	Длина волны максимума испускания (нм)
Триптофан	280–300	320–400
Тирозин	280–300	320–400
NADH	340–380	450–500
FAD	460–500	530–550
Коллаген	320–360	400, 460–500
Эластин	320–360	400, 460–500

стином. За наиболее интенсивные максимумы СФС-флуоресценции при $\Delta\lambda = 90$ нм отвечают триптофан и NADH [32–34]. Анализ полученных СФС-спектров аналогичен выполненному для СФС-спектров раковой и здоровой тканей молочной железы в работе [22]. Были выделены две интересные области: область «а», простирающаяся от 340 до 380 нм при $\Delta\lambda = 60$ нм и от 385 до 420 нм при $\Delta\lambda = 90$ нм, и область «б» в пределах 380–420 нм при $\Delta\lambda = 60$ нм и 420–500 нм при $\Delta\lambda = 90$ нм. Для количественного описания спектров мы использовали площади под нормированными спектрами в выбранных областях: S_{a60} – площадь под кривой в области «а» при $\Delta\lambda = 60$ нм, S_{b60} – площадь под кривой в области «б» при $\Delta\lambda = 60$ нм, S_{a90} – площадь под кривой в области «а» при $\Delta\lambda = 90$ нм и S_{b90} – площадь под кривой в области «б» при $\Delta\lambda = 90$ нм. При анализе использовались также шесть отношений: S_{a60}/S_{b60} , S_{a90}/S_{b90} , S_{a60}/S_{b90} , S_{b60}/S_{b90} , S_{a60}/S_{a90} и S_{b60}/S_{a90} . Значимость выбранных параметров для дифференциации тканей желудочно-кишечного тракта оценивалась в два этапа. Сначала были вычислены параметры для каждого спектра и применен критерий нормальности Шапиро–Уилка с уровнем значимости 0.05. Некоторые параметры не удовлетворяли критерию нормальности, в силу чего необходимо было использовать непараметрический алгоритм проверки гипотез. Поэтому применялся критерий Манна–Уитни со стандартным значением пороговой вероятности 0.05 и с принятой нуль-гипотезой о том, что

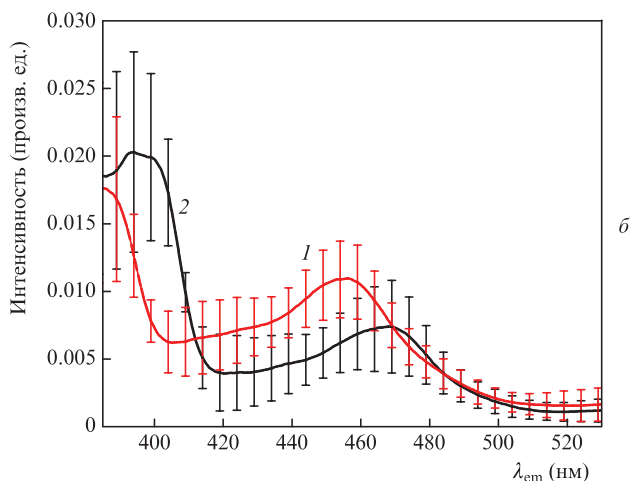
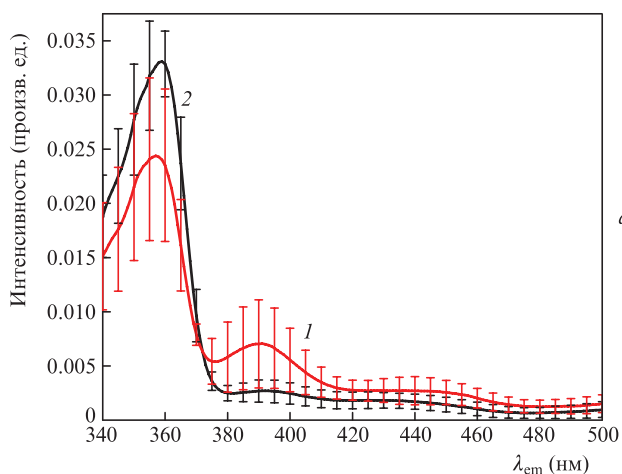


Рис.3. СФС-спектры здоровой (1) и раковой (2) тканей для $\Delta\lambda = 60$ (а) и 90 нм (б).

Табл.2. Результаты теста Манна–Уитни для оцениваемых спектральных параметров со значением вероятности p и оценкой уровня значимости.

Спектральный параметр	Вероятность p	Статистическая значимость*
S_{a60}	2.1448×10^{-4}	ПЗ
S_{b60}	2.10858×10^{-5}	ПЗ
S_{a90}	7.34006×10^{-6}	ПЗ
S_{b90}	0.04072	З
S_{a60}/S_{b60}	2.10858×10^{-5}	ПЗ
S_{a90}/S_{b90}	0.00405	ВЗ
S_{a60}/S_{b90}	0.00715	ВЗ
S_{b60}/S_{b90}	0.03251	З
S_{a60}/S_{a90}	0.00101	ВЗ
S_{b60}/S_{a90}	7.36123×10^{-6}	ПЗ

*Заключение о статистической значимости параметров принималось исходя из значения вероятности для нуль-гипотезы, а именно: $p > 0.05$ – не значимый (НЗ), $0.01 < p < 0.05$ – значимый (З), $0.001 < p < 0.01$ – весьма значимый (ВЗ), $p < 0.001$ – предельно значимый (ПЗ) [22].

различия между параметрами для раковой и здоровой ткани нет. Результаты теста приведены в табл.2.

Тест показывает, что пять параметров предельно значимы ($p < 0.001$), три весьма значимы ($0.01 < p < 0.001$) и два значимы ($0.01 < p < 0.05$) при дифференциации раковых и здоровых тканей, притом среди выбранных для анализа параметров не значимые ($p > 0.05$) вообще отсутствуют. Таким образом, выбранные интервалы между длинами волн возбуждения и испускания 60 и 90 нм дают достаточное число статистически значимых параметров для высокоспецифичной дифференциации тканей.

Однако полученные результаты касаются исследования тканей *ex vivo*, и при их перенесении на случай *in vivo* необходимо учитывать следующее: 1) вклад гемоглобина даст минимум в спектре флуоресценции примерно на $\lambda_{em} = 425$ нм за счет перепоглощения; 2) можно ожидать, что флуоресценция NADH будет более интенсивной, т. к. данный кофермент быстро распадается после иссечения ткани; 3) влияние температуры, которая в момент измерения была ниже температуры тела [35, 36].

4. Выводы

В настоящей работе для классификации тканей при раке толстого кишечника с помощью флуоресцентной спектроскопии предложены длины волн возбуждения в диапазоне 300–360 нм и интервалы между длинами волн возбуждения и испускания 60 и 90 нм для диагностически специфичных методов МВИ и СФС соответственно. СФС с использованием предложенных интервалов длин волн позволяет получать наиболее существенные различия, имеющие диагностическую значимость, спектров флуоресценции здоровых и раковых тканей.

Параметры, оцененные в настоящей работе, будут использованы как основа для надежного алгоритма обнаружения колоректального рака. Необходимы дальнейшие исследования потенциала флуоресцентного метода СФС по сравнению с другими оптическими диагностическими методиками обнаружения опухолей, поскольку первые результаты указывают на возможность получать с помощью СФС диагностически важные спектральные особенности с перспективой разработки методов, позволяю-

щих отличить нормальную слизистую оболочку толстого кишечника от пораженной раком.

Работа поддержана Национальным научным фондом Министерства образования и науки Болгарии (гранты № DFNI-B02/9/2014 и DMU-03-46/2011). Е.Борисова и Ц.Генова выражают свою признательность Акции ВМ1205 COST, Национальной программе стипендий WFS и Программе поддержки молодых ученых Академии наук Болгарии за финансирование в рамках гранта «Макроскопическая и микроскопическая флуоресцентная спектроскопия для исследования опухолей желудочно-кишечного тракта».

1. Jemal A., Bray F., Center M., Ferlay J., Ward E., Forman D. *CA Cancer J. Clin.*, **61** (2), 69 (2011).
2. Benson A.I. III. *J. Manag. Care Pharm.*, **13** (6), S5 (2007).
3. Young P.E., Womeldorph C.M. *J. Cancer.*, **4**, 217 (2013).
4. Barr H., Dix T., Stone N. *Lasers Med. Sci.*, **13**, 3 (1998).
5. Song M., Ang T. *Gastrointest. Interv.*, **3**, 1 (2014).
6. Fujiya M., Kohgo Y. *Gastrointestinal Endoscopy*, **77**, 111 (2013).
7. Johansson A., Kromer K., Sroka R., Stepp H. *Med. Laser Appl.*, **23**, 155174 (2008).
8. Hasan M., Wallace M. *Clin. Upd.*, **16**, 1 (2009).
9. Subramanian V., Ragunath K. *Clin. Gastroenterology Hepatology*, **12**, 368 (2014).
10. Ramanujam N. *Neoplasia*, **2** (1-2), 89 (2000).
11. Coda S., Thillainayagam A. *Clin. Experim. Gastroenterology*, **7**, 133 (2014).
12. Song L., Banerjee S., Desilets D., Diehl D., Farraye F., Kaul V., Kethu S., Kwon R., Mamula P., Pedrosa M., Rodriguez S., Tierney W. *Gastrointestinal Endoscopy*, **73**, 647 (2011).
13. Broek F., Fockens P., Dekker E. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **26**, 9199 (2007).
14. Aihara H., Sumiyama K., Saito S., Tajiri H., Ikegami M. *Gastrointestinal Endoscopy*, **69**, 726 (2009).
15. Tajiri H. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **83**, 248 (2007).
16. Richards-Kortum R., Rava R., Petras R., Fitzmaurice M., Sivak M., Feld M. *Photochem. Photobiol.*, **53**, 777 (1991).
17. Lloyd J. *Nat. Phys. Sci.*, **231**, 6465 (1971).
18. Vo-Dinh T. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3911**, 4249 (2000).
19. Zhang X., Fales A., Vo-Dinh T. *Sensors*, **15**, 21746 (2015).
20. Al-Thunayan M.A. *Cancer Diagnosis by Synchronous Fluorescence Spectra of Blood and Urine Components. PhD Thesis* (King Saud University, Kingdom of Saudi Arabia, 2006).
21. Masilamani V., Al Salhi M., Vijmasi T., Govindarajan K., Rathana Rai R., Atif M., Prasad S., Aldwayyan A.S. *J. Biomed. Opt.*, **17** (9), 098001 (2012).
22. Dramićanin T., Dramićanin M., Dimitrijević B., Jokanović V., Lukić S. *Acta Chim. Slov.*, **53**, 444 (2006).
23. Dramićanin T., Lenhardt L., Zeković I., Miroslav D. *J. Fluoresc.*, **22**, 1281 (2012).
24. Giubileo G., Colao F., Puiub A., Panzironi G., Brizzi F., Rocchini P. *Spectroscopy*, **19**, 79 (2005).
25. Jeyasingh E., Prakasarao A., Singaravelu G. *Photochem. Photobiol.*, **86**, 77 (2010).
26. Ramanujam N., in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Ed. by R.A. Meyers (Chichester: John Wiley & Sons, 2000, pp 20–56).
27. Hirayama A., Kami K., Sugimoto M., Sugawara M., Toki N., Onozuka H., Kinoshita T., Saito N., Ochiai A., Tomita M., Esumi H., Soga T. *Cancer Res.*, **69**, 4918 (2009).
28. Lunt S., Van der Heiden M. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27** (1), 441 (2011).
29. Li Y. *Separation of Endogenous Fluorophores in Normal and Cancer Cells. PhD Thesis* (University of Iowa, Iowa City, 2009).
30. DeClerck Y. *Eur. J. Cancer*, **36**, 1258 (2000).
31. Zhu C., Burnside E.S., Sisney G.A., Salkowski L.R., Harter J.M., Yu B., Ramanujam N. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **56** (10), 2518 (2009).
32. Han M., Lin Z., Zhang Y., Peng L., Chen Y. *Sci. Res. Essays*, **7** (2), 165 (2012).
33. Andersson-Engels S., Johansson J., Svanberg S. *Spectrochim. Acta, Part A*, **40**, 1203 (1990).
34. *Analytical Use of Fluorescent Probes in Oncology*. Ed. by E.Kohen, J.G.Hirschberg (Coral Gables, FL: Springer Science & Business Media, 2012).
35. Schomacker K., Frisoli J., Compton C., Flotte T., Richter J., Nishioka N., Deutsch T. *Lasers Surg. Med.*, **12** (1), 63 (1992).
36. Bottiroli G., Croce A., Locatelli D., Marchesini R., Pignoli E., Tomatis S., Cuzzoni C., Di Palma S., Dalfante M., Spinelli P. *Lasers Surg. Med.*, **16**, 48 (1995).