

# Исследование возможности увеличения интенсивности фотохимических процессов рибофлавин/УФ-фотосшивания коллагена склеры посредством иммерсионного просветления ткани

М.Е.Швачкина, Ю.В.Кистенев, А.Б.Правдин, Д.А.Яковлев

*Исследована возможность повышения эффективности фотовоздействия при рибофлавин/УФ-фотосшивании склеры посредством иммерсионного просветления ткани перед УФ облучением. Эффективность фотовоздействия оценивалась по степени снижения относительного содержания сенсibilизатора фотосшивания – рибофлавина, которое определялось по временам затухания флуоресценции ткани на разных этапах процесса фотосшивания. Времена затухания флуоресценции образцов измерялись с помощью мультифотонного томографа в режимах регистрации двухфотонной флуоресценции с временным разрешением. Исследования проводились in vitro на образцах склеры свиньи. В качестве иммерсионного просветляющего агента использовался 88%-ный водный раствор глицерина. Показано, что оптическое просветление позволяет увеличить интенсивность фотоиндуцированного превращения рибофлавина в нефлуоресцирующие лейкоформы в ходе фотохимических реакций, предшествующих сшиванию коллагена. Так, согласно полученным экспериментальным данным для случаев фотосшивания без оптического просветления и с предварительным оптическим просветлением ткани при одинаковых условиях облучения, содержание не подвергшегося фотопревращению рибофлавина в ткани на глубинах от 40 до 75 мкм после УФ облучения в первом случае оказалось приблизительно в 5.6 раза (среднее по 15 областям двух образцов) больше, чем во втором.*

**Ключевые слова:** рибофлавин/УФ-фотосшивание, склера, двухфотонная флуоресценция с временным разрешением, оптическое иммерсионное просветление.

## 1. Введение

Рибофлавин/УФ-фотосшивание является методом целенаправленного увеличения уровня поперечного связывания коллагеновой структуры биологической ткани в результате УФ облучения в присутствии фотосенсибилизатора – рибофлавина [1–12]. Одним из результатов такого воздействия является увеличение механической прочности ткани [2, 3, 6, 8–11]. Метод рибофлавин/УФ-фотосшивания уже используется в офтальмологии для укрепления роговицы при кератэктазиях [2–5]. В настоящее время в экспериментах на животных и ткани склеры *ex vivo* изучаются возможности применения этого метода для модификации свойств склеры [6–13]. Реализация рибофлавин/УФ-фотосшивания коллагена склеры сопряжена с определенными сложностями [11, 14], одна из которых связана с тем, что в нативной склере, в отличие от роговицы, имеет место сильное рассеяние света, приводящее к резкому падению интенсивности УФ излучения и, как следствие, к снижению скорости фотохимических реакций в глубине ткани. Возможным способом увеличения глубины проникновения УФ излучения в ткань при фотосшивании склеры является иммерсионное оптическое просветление склеры перед облучением ультрафиолетом, поскольку известно,

что такое просветление склеры позволяет значительно увеличить ее прозрачность, в том числе и в УФ области [14–18].

Цель настоящей работы – сравнение интенсивности фотохимических процессов рибофлавин/УФ-фотосшивания коллагена склеры без иммерсионного просветления и с иммерсионным просветлением по данным мониторинга изменений относительного содержания рибофлавина в ткани, обусловленных фотохимическими процессами, связанными с фотосшиванием.

Диффузия флуоресцирующего при УФ возбуждении [19, 20] рибофлавина в ткань и его фотохимические превращения, происходящие при рибофлавин/УФ-фотосшивании, приводят к существенным изменениям интенсивности флуоресценции ткани [21–25]. В случае роговицы это используется для оценки как средней концентрации рибофлавина в ткани, так и распределения рибофлавина по ее толщине на разных этапах фотосшивания [22–25]. Локальная концентрация рибофлавина в роговице в [22–23, 25] оценивалась с помощью двухфотонной флуоресцентной конфокальной микроскопии. Для оценки содержания рибофлавина использовались измеренные зависимости средней по времени интенсивности регистрируемого сигнала флуоресценции от глубины. В случае склеры использовать этот подход не позволяет сильное рассеяние света в ткани. В настоящей работе вклад флуоресценции экзогенных флуорофоров (рибофлавина и флуоресцирующих продуктов его фотопревращений) на разных этапах рибофлавин/УФ-фотосшивания оценивался по величине среднего времени затухания флуоресценции зондируемого объема ткани, определяемого по данным FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy).

М.Е.Швачкина, А.Б.Правдин, Д.А.Яковлев. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: marevesh@mail.ru

Ю.В.Кистенев. Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36

Поступила в редакцию 11 ноября 2020 г.

## 2. Методика эксперимента. Образцы

Эксперименты проводились на препаратах склеры свиньи. Перед экспериментами склера тщательно очищалась от сетчатки и разрезалась в сагиттальном направлении на полоски размером  $0.5 \times 1.3$  см. Использовались тканевые блоки, взятые из экваториальной области глазного яблока. До измерений и между ними образцы хранились в физрастворе (0.9%-ный водный раствор NaCl) при температуре  $4^\circ\text{C}$ .

На первом этапе обработки образцы склеры пропитывались 0.1%-ным раствором рибофлавина в течение 20 мин в соответствии с методикой фотосшивания, описанной в работах [8–11]. Часть образцов подвергалась иммерсионному просветлению. В качестве иммерсионного агента нами использовался 88%-ный водный раствор глицерина, в котором образцы выдерживались 20 мин. Предварительные эксперименты показали, что за это время объем образцов склеры становится минимальным [26]. Затем образцы 30 мин облучались УФ светодиодом с максимумом излучения при длине волны 370 нм; интенсивность облучения образца составляла  $3 \text{ мВт/см}^2$ . После такой УФ обработки образцы находились в физрастворе в течение суток.

Для характеристики образцов использовался мультифотонный томограф JenLab MPTflex (Германия) с перестраиваемым титан-сапфировым фемтосекундным лазером ближнего ИК диапазона. Данный прибор регистри-

рует сигналы флуоресценции образца, возбуждаемой при двухфотонном поглощении излучения лазера, при помощи ФЭУ, позволяя измерять время затухания флуоресценции образцов и использовать технику FLIM. Образцы освещались излучением с длительностью импульса 200 фс и частотой следования 80 МГц. Центральная длина волны лазера составляла 760 нм, мощность излучения – 50 мВт. Числовая апертура объектива  $NA = 1.3$  обеспечивала пространственное разрешение 0.5 мкм в латеральном направлении и 2 мкм – в аксиальном. Регистрируемый сигнал флуоресценции является интегральным по спектральному диапазону 409–680 нм.

При фотосшивании без просветления образцов FLIM-измерения проводились на следующих стадиях: 1) после выдерживания образца в растворе рибофлавина; 2) сразу же после УФ обработки; 3) после длительного (одни сутки) выдерживания образцов в физрастворе (для вымывания рибофлавина и продуктов фотолиза из образца). При фотосшивании с просветлением образцов FLIM-измерения осуществлялись: 1) после выдерживания образца в растворе рибофлавина; 2) после выдерживания в растворе глицерина (оптическое просветление); 3) сразу же после УФ обработки; 4) после выдерживания образцов в физрастворе в течение суток.

На рис.1 представлены FLIM-изображения образцов склеры в нативном состоянии и на разных стадиях рибофлавин/УФ-фотосшивания без оптического просветления (рис.1, а) и с оптическим просветлением (рис.1, б) на

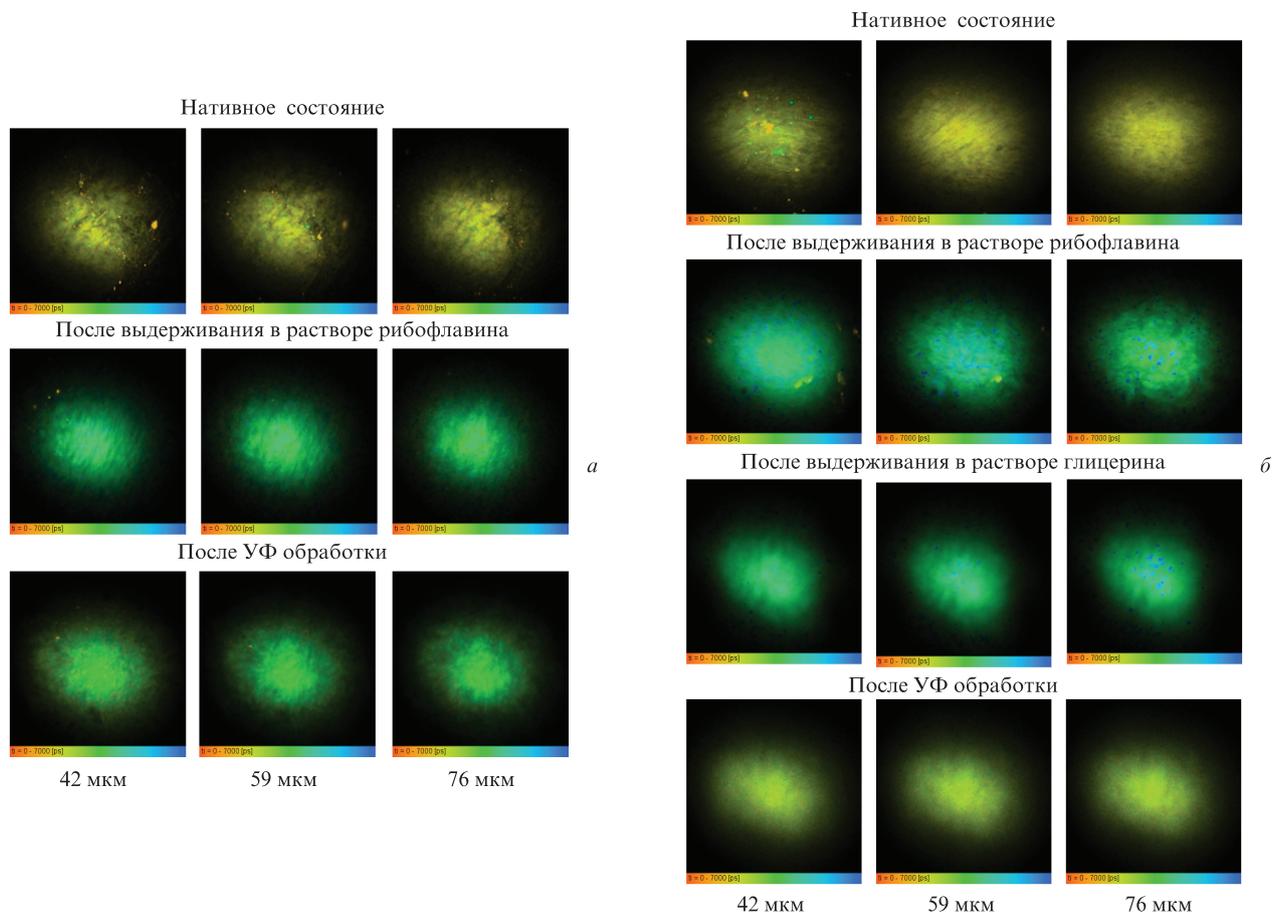


Рис.1. FLIM-изображения склеры в нативном состоянии и на разных этапах рибофлавин/УФ-фотосшивания без оптического просветления (а) и с оптическим просветлением (б) на глубинах 42, 59 и 76 мкм. Цветной вариант рис.1 помещен на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

разных глубинах. Эти изображения позволяют визуализировать значение среднего времени затухания флуоресценции  $\tau_i$  (см. ниже).

На первой стадии (после выдерживания образца в растворе рибофлавина) флуоресценция образцов определяется главным образом флуоресценцией эндогенных флуорофоров и рибофлавина. В ходе оптического просветления из ткани выходит некоторое количество воды, а небольшое количество глицерина (не флуоресцирующего при возбуждении на длине волны  $\lambda = 380$  нм) проникает в ткань. В ходе УФ обработки при интенсивном течении фотохимических реакций, связанных с фотосшиванием, вклад флуоресценции рибофлавина в суммарную флуоресценцию должен существенно уменьшиться. Хорошо известно, что под действием УФ излучения растворы рибофлавина могут частично обесцвечиваться в результате превращения некоторой части рибофлавина в лейкофлавин (1,5-дигидрорибофлавин) [19–21]. Лейкофлавин бесцветен, имеет значительно меньший коэффициент экстинкции при  $\lambda = 380$  нм, чем рибофлавин [19, 21], и не флуоресцирует [20, 27]. Последним обусловлен тот факт, что частичное превращение рибофлавина в лейкофлавин приводит к уменьшению флуоресценции раствора, и это уменьшение тем больше, чем больше рибофлавина превратилось в лейкофлавин и чем большей является текущая концентрация лейкофлавина в растворе – лейкофлавин, взаимодействуя с молекулярным кислородом, может превращаться во флуоресцирующие вещества, такие как формилметилфлавин, люмифлавин, люмихром [20, 21, 27–29], а также обратно в рибофлавин [28]. Формилметилфлавин и люмифлавин имеют аналогичные рибофлавиновым свойства поглощения и флуоресценции [30–34]. Люмихром при рассматриваемых условиях возбуждения, в отличие от рибофлавина, максимально флуоресцирует не в зеленой, а в синей области спектра [27, 31, 33, 35, 36]. Эксперименты по фотосшиванию роговицы показывают, что при стандартных концентрациях используемого раствора рибофлавина и плотности УФ облучения интенсивность флуоресценции пропитанной рибофлавином ткани в процессе УФ обработки в области 500–600 нм существенно уменьшается [22–24]. Также существенно уменьшается и поглощение ткани в ближней УФ области [37]. Так, в эксперименте, описанном в работе [37], непосредственно после пропитывания роговицы рибофлавином и через 5 и 30 мин от начала УФ обработки измеренные значения коэффициента пропускания образца на длине волны 370 нм составили соответственно 24%, 75% и 94% относительно его исходного значения (до пропитывания рибофлавином). Такие изменения коэффициента пропускания образца указывают на резкое увеличение концентрации лейкофлавина в экспонируемой области за счет превращения рибофлавина → лейкофлавин и малость вклада в оптические свойства образца на временном интервале 5–30 мин от начала УФ обработки других производных рибофлавина из-за их малой концентрации (при  $\lambda = 380$  нм коэффициенты экстинкции формилметилфлавина, люмифлавина и люмихрома сравнимы с коэффициентом экстинкции рибофлавина). Это дает основания полагать, что в качестве одного из признаков интенсивного хода фотохимических реакций, предшествующих сшиванию коллагена, может рассматриваться значительное уменьшение вклада (интенсивности) флуоресценции экзогенных флуорофоров в ткани в процессе ее УФ обработки.

Как было отмечено выше, в рассматриваемом нами эксперименте вклад флуоресценции экзогенных флуорофоров на разных стадиях оценивался по величине среднего времени затухания флуоресценции, определяемого по данным FLIM. Как показали измерения, среднее время затухания флуоресценции стромы нативной склеры при возбуждении на длине волны 380 нм составляет порядка  $2.03 \pm 0.24$  ( $\pm$ SD) нс. Среднее время затухания флуоресценции рибофлавина при таких условиях возбуждения значительно больше и составляет около 4 нс (по данным наших измерений –  $4.03 \pm 0.02$  нс). Для образцов склеры, пропитанных рибофлавином, среднее время затухания флуоресценции составило  $3.98 \pm 0.15$  нс. Исходя из этого можно ожидать, что при интенсивном течении фотохимических реакций среднее время затухания флуоресценции образца будет значительно уменьшаться, приближаясь к его значению для нативного состояния. В противном случае после фотообработки образца оно должно изменяться мало.

Среднее время затухания флуоресценции для образцов склеры на разных стадиях эксперимента оценивалось с использованием аппроксимации экспериментальной локальной функции затухания флуоресценции двухэкспоненциальной функцией [38]

$$\tilde{F}(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}, \quad (1)$$

где  $\tau_1$  и  $\tau_2$  – характерные времена затухания флуоресценции компонент двухкомпонентной системы;  $a_1$  и  $a_2$  – интенсивности флуоресценции компонент в начальный момент времени. Локальное значение среднего времени затухания флуоресценции рассчитывалось по следующей формуле [38]:

$$\tau_i = \frac{a_1 \tau_1^2 + a_2 \tau_2^2}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}. \quad (2)$$

Расчеты проводились с помощью программы обработки данных SPCImage 6.4. На каждом FLIM-изображении выделялась область площадью приблизительно  $0.023 \text{ мм}^2$  ( $\sim 28000$  пикселей), для которой рассчитывалось среднее по площади значение  $\tau_i$ . Конечное среднее значение,  $\langle \tau_i \rangle$ , рассчитывалось путем усреднения полученных таким образом средних по площади значений  $\tau_i$  по разным участкам образца и разным образцам. Представленные ниже значения  $\langle \tau_i \rangle$  были получены как средние для диапазона глубин 40–75 мкм.

### 3. Результаты эксперимента

На рис.2,а представлены полученные значения  $\langle \tau_i \rangle$  (усреднение производилось по 15 областям двух образцов) ткани на разных стадиях процесса фотосшивания без оптического просветления. Видно, что УФ обработка образцов привела к небольшому уменьшению среднего времени затухания флуоресценции  $\langle \tau_i \rangle$  – с  $3.97 \pm 0.35$  нс до  $3.48 \pm 0.02$  нс, что свидетельствует о некотором уменьшении вклада экзогенных флуорофоров в суммарную флуоресценцию образца. После выдерживания этих образцов в физрастворе в течение суток  $\langle \tau_i \rangle$  значительно приблизилось к его среднему значению для образцов в нативном состоянии ( $2.03 \pm 0.24$  нс) и составило  $2.48 \pm 0.02$  нс. Различие этих времен свидетельствует о присутствии в ткани после ее выдерживания в физрастворе некоторого

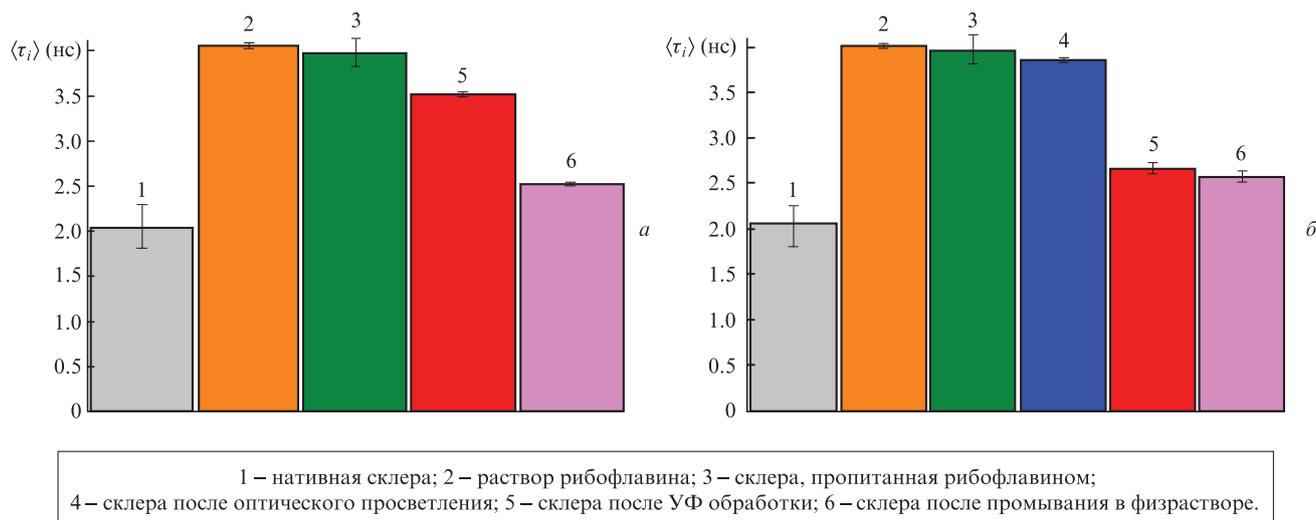


Рис.2. Среднее время затухания флуоресценции в образцах склеры на разных стадиях процесса рибофлавин/УФ-фотосшивания, проводимого без иммерсионного просветления (а) и с иммерсионным просветлением (б).

остаточного количества экзогенных флуорофоров (рибофлавина и его флуоресцирующих производных).

На рис.2,б представлены средние значения  $\langle \tau_i \rangle$  (по 15 областям двух образцов), полученные на разных стадиях процесса фотосшивания с оптическим просветлением. Иммерсионное просветление образца в растворе глицерина приводило к небольшому уменьшению  $\langle \tau_i \rangle$ , до  $3.86 \pm 0.03$  нс. Вероятнее всего, это связано с частичным вымыванием рибофлавина при дегидратации ткани под действием иммерсионного агента. УФ обработка образца в условиях иммерсионного просветления приводила к значительному уменьшению среднего времени затухания флуоресценции, до  $2.67 \pm 0.05$  нс, существенно большему, чем в случае, когда просветление не использовалось ( $3.48 \pm 0.02$  нс). Это свидетельствует о том, что при УФ обработке образца в условиях иммерсионного просветления фотохимические реакции, предшествующие сшиванию коллагена, протекают более интенсивно.

На основе представленных данных мы оценили отношение количества рибофлавина в ткани после УФ обработки при фотосшивании на непросветленных образцах к количеству рибофлавина в ткани после УФ обработки просветленных образцов. Если для двух состояний ткани, различающихся содержанием рибофлавина, – состояния 1 с содержанием рибофлавина  $Q_1$  и состояния 2 с содержанием рибофлавина  $Q_2$  – известны средние времена затухания флуоресценции, обозначим их  $\langle \tau_i^{(ct1)} \rangle$  и  $\langle \tau_i^{(ct2)} \rangle$ , то в предположении о неизменности времен затухания флуоресценции эндогенных компонентов и рибофлавина в ткани отношение  $Q_2/Q_1$  может быть приближенно оценено с помощью формулы

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{(\langle \tau_i^{(ct2)} \rangle - \langle \tau_i^{(nt)} \rangle)(\langle \tau_i^{(r)} \rangle - \langle \tau_i^{(ct1)} \rangle)}{(\langle \tau_i^{(r)} \rangle - \langle \tau_i^{(ct2)} \rangle)(\langle \tau_i^{(ct1)} \rangle - \langle \tau_i^{(nt)} \rangle)}, \quad (3)$$

где  $\langle \tau_i^{(nt)} \rangle$  – среднее время затухания флуоресценции для ткани в нативном состоянии (эндогенных флуорофоров);  $\langle \tau_i^{(r)} \rangle$  – среднее время затухания флуоресценции рибофлавина. К сожалению, в нашем случае при рассмотрении состояний до УФ обработки (сразу после выдерживания в растворе рибофлавина) и после нее формула (3) не позволяет корректно оценить изменение количества рибофлавина в ткани из-за очень малого различия значений  $\langle \tau_i \rangle$

для раствора рибофлавина и для ткани, пропитанной раствором рибофлавина (их разность имеет тот же порядок, что и погрешность экспериментальной оценки этих времен). Однако данная формула может быть использована для сравнения содержания рибофлавина в ткани после УФ обработки в случае фотосшивания без оптического просветления и с предварительным оптическим просветлением ткани. Из (3) следует, что в первом случае содержание рибофлавина в ткани после УФ обработки приблизительно в 5.6 раза (среднее по 15 областям двух образцов) больше, чем во втором.

#### 4. Заключение

Таким образом, с использованием техники FLIM на образцах склеры свиньи нами экспериментально показано, что применение иммерсионного просветления перед УФ облучением при рибофлавин/УФ-фотосшивании склеры позволяет повысить интенсивность протекания в ее толще фотохимических процессов, связанных с фотосшиванием коллагена, – тем самым продемонстрирована принципиальная возможность повышения эффективности рибофлавин/УФ-фотосшивания склеры посредством использования иммерсионного просветления ткани. Предложена применимая *in vivo* методика FLIM-мониторинга содержания рибофлавина в ткани после УФ обработки. Оценка реального потенциала введения этапа иммерсионного просветления в протокол рибофлавин/УФ-укрепления склеры человека требует многих дополнительных исследований, прежде всего связанных с вопросами безопасности, в частности с обеспечением сохранности сетчатки глаза при УФ облучении в условиях просветления. Последнее, по всей видимости, делает допустимой только небольшую степень оптического просветления склеры, которая может быть достигнута с помощью менее концентрированных растворов глицерина, чем использовавшийся в настоящей работе. Вообще говоря, практическое применение для просветления склеры *in vivo* высококонцентрированных растворов глицерина вряд ли возможно из-за многих негативных побочных действий, таких как обезвоживание сосудистой сети [39], снижение скорости кровотока, частичная диссоциация коллагена ткани [40,41]. Относительная безопасность использования для оптиче-

ского просветления ткани *in vivo* растворов глицерина умеренной концентрации (не более 30%) экспериментально продемонстрирована в [42] на коже крысы. Также перспективным для просветления склеры представляется препарат Омнираке™ (он широко используется в медицинской практике в качестве рентгеноконтрастного вещества), способный выполнять роль биосовместимого иммерсионного просветляющего агента [43].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проектов №18-52-16025\18, 17-00-00275 (17-00-00272 и 17-00-00186) и РНФ в рамках проекта №19-12-00118.

1. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. *Am. J. Ophthalmol.*, **135**(5), 620 (2003).
2. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. *Вестник РАМН*, **71**(3), 224 (2016).
3. Бикбов М.М., Суркова В.К. *Офтальмология*, **11**(3), 13 (2014).
4. Иомдина Е.Н. *Российская педиатрическая офтальмология*, **10**(4), 32 (2015).
5. Иомдина Е.Н., Коригодский А.Р., Хорошилова-Маслова И.П. и др. *Российский офтальмологический журнал*, **10**(4), 54 (2017).
6. Бикбов М.М., Суркова В.К., Усубов Э.Л., Астрелин М.Н. *Офтальмология*, **12**(4), 4 (2016)
7. Иомдина Е.Н., Тарутга Е.П., Семчишен В.А. и др. *Вестник офтальмологии*, **132**(6), 49 (2016).
8. Wollensak G., Spoerl E. *JCRS*, **30**(3), 689 (2004).
9. Wollensak G., Iomdina E. *Acta Ophthalmol.*, **87**(2), 193 (2009).
10. Wollensak G., Iomdina E., Dittert D. D., Salamatina O., Stoltenburg G. *Acta Ophthalmol.*, **83**(4), 477 (2005).
11. Zhang Y., Li Z., Liu L., Han X., Zhao X., Mu G. *BioMed. Res. Int.*, **2014**, 1 (2014).
12. Dotan A., Kremer I., Livnat T., et al. *Exp. Eye Res.*, **127**, 190 (2014).
13. Астрелин М.Н. Канд. дис. (Уфа, Уфимский НИИ глазных болезней, 2018).
14. Швачкина М.Е., Правдин А.Б. *Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Физика*, **15**(4), 37 (2015).
15. Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham: SPIE press, 2015).
16. Tuchin V.V., Bashkatov A.N., Genina E.A., Sinichkin Y.P. *Proc. SPIE*, **4611**, 54 (2002).
17. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И. и др. *Изв. Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Физика*, **15**(3), 18 (2015).
18. Zaman R.T., Rajaram N., Nichols B.S., et al. *Biomed. Opt.*, **16**(7), 077008 (2011).
19. Song S.H., Dick B., Penzkofer A. *J. Chem. Phys.*, **332**(1), 55 (2007).
20. Green M. *Ph.D. thesis* (The University of Arizona, 1967).
21. McQuaid R M. *Ph.D. thesis* (University College Dublin. School of Physics, 2017).
22. Lombardo G., Micali N.L., Villari V., Serrao S., Lombardo M. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **57**(2), 476 (2016).
23. Lombardo G., Micali N.L., Villari V., Leone N., Serrao S., Rusciano D., Lombardo M. *JCRS*, **43**(5), 680 (2017).
24. Lombardo G., Villari V., Micali N.L., Leone N., Labate C., De Santo M.P., Lombardo M.J. *Biophoton.*, **11**(7), e201800028 (2018).
25. Seiler T.G., Batista A., Frueh B.E., Koenig K. *IVOS*, **60**(6), 2140 (2019).
26. Shvachkina M.E., Knyazkova A.I., Sandykova E.A. *J. Phys. Conf. Ser.*, **1145**(1), 012056 (2019).
27. Константинова-Шлезингер М.А. *Люминесцентный анализ* (М: Физматгиз, 1961).
28. Mazzotta C., Raiskup F., Baiocchi S., et al. *Management of Early Progressive Corneal Ectasia: Accelerated Crosslinking Principles* (Cham: Springer, 2017, p. 214).
29. Kamaev P., Friedman M.D., Sherr E., Muller D. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **53**(4), 2360 (2012).
30. Sheraz M.A., Kazi S.H., Ahmed S., Qadeer K., Khan M.F., Ahmad I. *Cent. Eur. J. Chem.*, **12**(6), 635 (2014).
31. Smith E.C. *Ph.D. thesis* (Iowa State University of Science and Technology 1963).
32. Tether L.R., Turnbull J.H. *Biochem. J.*, **85**(3), 517 (1962).
33. Holzer W., Shirdel J., Zirak P., Penzkofer A., Hegemann P., Deutzmann R., Hochmuth E. *J. Chem. Phys.*, **308**(1-2), 69 (2005).
34. Koziol J., Knobloch E. *Biochim. Biophys. Acta.*, **102**(1), 289 (1965).
35. Tyagi A., Penzkofer A. *Photochem. Photobiol.*, **87**(3), 524 (2011).
36. Шнайман Л.О. *Производство витаминов* (М.: Пищевая промышленность, 1973).
37. Caruso C., Barbaro G., Epstein R.L., et al. *Cornea*, **35**(5), 659 (2016).
38. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (New York: Springer Science+Business Media, 2006, p. 960).
39. Vargas G., Readinger A., Dozier S.S., Welch A.J. *Photochem. Photobiol.*, **77**(5), 541 (2003).
40. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V.V., Zhu D. *J. Biophoton.*, **3**(1), 44 (2010).
41. Costantini I., Cicchi R., Silvestri L., Vanzi F., Pavone F.S. *Biomed. Opt. Express*, **10**(1), 5251 (2019).
42. Mao Z., Han Z., Wen X., Luo Q., Zhu D. *Fiber Opt. Commun. Sens.*, **7278**, 72781T (2009).
43. Sdobnov A.Y., Darvin M.E., Genina E.A., et al. *Spectrochim. Acta A*, **197**, 216 (2018).