

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 – «Физика»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(Бакалаврская работа)

**«ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО СВЕТА УФ
ДИАПАЗОНА НА КЛЕТКИ ФИБРОБЛАСТОВ И КЕРАТИНОЦИТОВ, А
ТАКЖЕ НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ ПТЕРИНОВ»**

Студентка 4 курса

Группы 06-511

«18» июня 2019 г.

 (Орлова Э.Э.)

Научный руководитель

доцент, к.ф.-м.н.

«18» июня 2019 г.

 (А.С. Низамутдинов)

Заведующий кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

«18» июня 2019 г.

 (А.В. Аганов)

Казань-2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
1.1 Лазерная фототерапия.....	4
1.2 Низкоинтенсивная лазерная терапия в медицине	5
1.3 Лечение псориаза	5
1.4 Лечение витилиго.....	7
1.5 Процессы окисления птеринов	9
1.6 Кристаллы, активированные ионами Ce^{3+}	10
1.7 Межконфигурационные 5d-4f переходы ионов Ce^{3+}	12
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	15
2.1 Создание макетов лазеров УФ диапазона на активных средах $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$	15
2.2 Методика измерений	17
2.3 Культивирование клеток–фибробластов	18
2.4 Культивирование клеток–кератиноцитов	20
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	21
3.1 Оценка изменения жизнеспособности фибробластов кожи человека под действием когерентного излучения при помощи МТТ – теста.....	21
3.2 Оценка изменения жизнеспособности кератиноцитов кожи человека под действием когерентного излучения при помощи МТТ – теста.....	24
3.3 Динамика окисления раствора птеринов.....	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	31
Список использованных источников	32

ВВЕДЕНИЕ

В медицине достаточно давно применяется низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Клинически описаны его основные эффекты, к ним можно отнести противовоспалительный и стимулирующий. На данный момент не существует общей теории, которая объясняет системное действие НИЛИ, но все же эти подходы успешно применяются в терапии патологий кожи, таких как витилиго и псориаз.

Одним из наиболее актуальных направлений для лечения псориаза и витилиго является фототерапия. Исследованиями доказано, что активный лечебный спектр ультрафиолетовых (УФ) лучей расположен в диапазоне от 296 до 313 нм. Особый научный интерес представляет характеристика действия когерентного излучения на жизненные показатели клеток фибробластов и кератиноцитов. Фибробласты- клетки соединительной ткани организма, синтезирующие внеклеточный матрикс, а кератиноциты- основные клетки эпидермиса кожи человека (составляют примерно 90% всех клеток эпидермиса). Изменения параметров жизнедеятельности этих клеток происходят при развитии многих патологий. Другим перспективным подходом к терапии витилиго является управление процессами окисления птеринов.

Исходя из вышесказанного целью настоящей работы было исследование воздействия лазерного света УФ диапазона на клетки фибробластов и кератиноцитов, а также на процессы окисления птеринов.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- 1) Создание твердотельного лазера на активных средах $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ и исследование их характеристик.
- 2) Культивирование клеток–фибробластов, кератиноцитов. Облучение этих клеток когерентным излучением УФ диапазона спектра.
- 3) Оценка жизнеспособности клеток кожи человека под действием когерентного излучения.
- 4) Оценка динамики окисления раствора птеринов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лазерная фототерапия

Фототерапия уже давно применяется для лечения витилиго, псориаза, атопического дерматита и других видов дерматологических заболеваний. Данный метод использует неонизирующее излучение, в первую очередь, в УФ спектре.

Известно, что солнечное излучение, достигшее поверхности Земли, подразделяется на длинноволновые УФ лучи УФА (320 – 400 нм), средневолновые УФ лучи УФБ (280 – 320 нм) и коротковолновые УФ лучи УФС (100 – 280 нм) [1].

Проникающая способность света имеет решающее значение для фототерапии. УФБ лучи в основном остаются в эпидермисе и верхнем слое дермы, тогда как УФА спектр глубоко проникает в дерму, так как имеет более длинные волны [2]. УФБ излучение чаще всего воздействует на клетки эпидермиса и кожно-эпитедермального соединения, а УФА лучи влияют на дермальные компоненты, в частности на дермальные кровеносные сосуды [3]. Когда сквозь кожу проходит свет, его поглощают хромофоры, это приводит к инициации различных химических реакций. Мишенью УФБ лучей является ядерная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Эффектами взаимодействия являются ДНК – фотопродукты и повреждение ДНК, которое в свою очередь приводит к апоптозу клеток кожи (фибробластов, кератиноцитов и циркулирующих иммунных клеток). Пролонгированный эффект включает индукцию облучением противовоспалительных простагландинов и цитокинов. Локальное и системное подавление иммунитета, изменение экспрессии цитокинов и нарушение функционирования нормального клеточного цикла способствует подавлению болезни и применение данного вида излучения в медицинской практике [4].

1.2 Низкоинтенсивная лазерная терапия в медицине

Действие лазерного излучения на живые биологические объекты многообразно и в целом зависит от времени и интенсивности излучения, плотности потока и длины волны [5].

В зависимости от интенсивности лазера, выделяют четыре основные направления:

1. Лазерная хирургия. Используется излучение большой мощности, благодаря которому происходит местный разогрев ткани;

2. Фотодинамическое лечение опухолей. Применяется комбинация НИЛИ и фотосенсибилизаторов;

3. Лазерная терапия. Используется НИЛИ в отсутствие фотосенсибилизаторов. Заинтересованность при этом вызывает наблюдаемая активация жизненных процессов – биостимуляция. Но при воздействии больших доз лазерного излучения благоприятный эффект заменяется угнетением, что является главной преградой для обширного использования лазерной терапии в медицине;

4. Неинвазивная диагностика. Употребляются весьма невысокие интенсивности света, благодаря которым возможно исследовать живые объекты, никак не приводя к значительным изменениям в его поведении [6].

1.3 Лечение псориаза

Псориаз является хроническим, воспалительным и обезображивающим заболеванием [7]. Он приводит к появлению отличительных красных бляшек на поверхностях кожи. По распространенности в популяции встречается у 1 – 3 % населения мира.

Данное заболевание связано с генетическим нарушением в иммунной системе. Было идентифицировано 8 хромосомных локусов PSOR I-VIII, которые связаны с псориазом. PSOR I (или HLA-Cw6) является основным

геном восприимчивости болезни и связан с ранним ее проявлением. Псориаз также считается косвенно иммунологическим заболеванием, поскольку псориазные бляшки содержат увеличенное количество Т – клеток, клеток Лангерганса и нейтрофилов. Помимо этого, в области поражения обнаружена повышенная экспрессия цитокинов, например, фактор некроза опухоли (TNF) - α , интерферона (IFN) - γ , интерлейкина (IL) -12 и IL-23. Известно, что IL-23 индуцирует продукцию IL-17A, IL-17F и IL-22 путем активации Т-хелперных (Th17) клеток. Возможность использования иммунодепрессантов, таких как ингибиторы TNF- α и ингибиторы IL-12/23 и IL-17, подтверждают теорию иммунной дисрегуляции в этиологии псориаза [8].

Использование широкополосного УФБ излучения было прорывным терапевтическим методом для борьбы с псориазом. Однако в более поздних исследованиях было установлено, что узкополосное УФБ излучение быстрее удаляет псориазные бляшки и даёт более продолжительную ремиссию, тем самым данный фототерапевтический метод имеет широкое распространение [9].

Терапевтический механизм фототерапии при псориазе – это иммуномодуляция. УФ непосредственно влияет на клетки Лангерганса в эпидермисе и ингибирует их способность представлять антиген в Т-клетку. Таким образом, это косвенно влияет на свехэкспрессию цитокинов и молекул адгезии в псориазных бляшках. Фототерапия также подавляет экспрессию цитокинов и изменяет профили цитокинов Th2 и Th1. Другой предложенный механизм заключается в том, что фототерапия подавляет гиперпролиферацию эпидермиса и ангиогенез путем вмешательства в синтез белков и нуклеиновых кислот [8].

Заметное сокращение псориазных бляшек наблюдается после фототерапии 308 нм эксимерным лазером (рисунок 1).



А



Б

Рисунок 1 - Псориазные поражения на ноге пациента в начале исследования (А) и после 19 облучений эксимерным лазером 308 нм (Б) [10]

Он показал более высокую эффективность, чем применение таких известных препаратов местной терапии псориаза, как дитранол, флуометазон, кальципотриол, каждый из которых применяется индивидуально. Достоверных различий терапевтического эффекта при использовании 308 нм эксимерного лазера и эксимерной лампы не было выявлено [7].

1.4 Лечение витилиго

Витилиго – приобретенное заболевание кожного покрова, характеризующееся одним или несколькими депигментированными пятнами, возникающими в результате исчезновения меланоцитов. Встречается с распространенностью 0.5 – 1% в популяциях от общего населения. Его классифицируют как фокальный, генерализованный, сегментный или универсальный, а поражения могут влиять на любую часть тела. Чаще всего витилиго локализуется на руках, ногах, суставах и на лице. У пациентов наблюдается пониженное качество жизни и повышенный риск развития психологических заболеваний. Патогенез не изучен до конца, предложены многочисленные механизмы развития данного заболевания, в том числе аутоиммунные и нейронные [11]. Недавно была предложена новая теория на

основе *in vivo* наблюдений, согласно которой возникновение данного расстройства может быть связана с отслоением меланоцитов от базального слоя, за которой следует транс-эпидермальная миграция и смерть меланоцитов [12].

В данный момент предложено несколько способов лечения витилиго. Местная терапия включает актуальные кортикостероиды, трансплантацию меланоцитов, и ингибиторы кальциневрина. Фототерапия, в свою очередь, индуцирует апоптоз цитотоксических Т-клеток, которые несут ответственность за разрушение меланоцитов, стимулирует пролиферацию меланоцитов и миграцию в эпидермис из волосяных фолликулов [12]. «Золотой стандарт» терапии витилиго включает в себя фототерапию, в качестве монотерапии или в сочетании с ингибиторами кальциневрина или аналогами витамина D3. Такое лечение является эффективным в 50 – 75 % случаев у пациентов в начале заболевания (Рисунок 2). Было отмечено, что поражения лица более чувствительны к фототерапии, чем депигментированные пятна на руках и ногах. Также были предложены УФА (ПУВА - терапия), УФА1 (340–400 нм), УФА2 (320–340 нм), широкополосная УФБ - терапия (290–320 нм), узкополосная УФБ - терапия (311–313 нм), и монохроматический эксимерный лазер 308 нм (МЭЛ) [11].



А



Б

Рисунок 2 - Повреждение витилиго на коленях пациента до облучения (А)

и после облучения: правую сторону обработали эксимерным лазером 308 нм (МЭЛ) (окончательный результат репигментации), левую сторону облучали NB-UVB (конечная оценка репигментации) (Б) [12]

ПУВА – терапия уже широко используется для лечения витилиго с удовлетворительным результатом. ПУВА усиливает репигментацию разными путями: стимулирует меланогенез, обладает иммуномодулирующим действием, активирует экспрессию факторов роста, хотя точные механизмы ещё слабо изучены. Цель данной терапии заключается в том, чтобы вызвать фототоксическую реакцию, после чего следует пигментация кожи [9]. Тем не менее, УФБ–терапия является более предпочтительным вариантом из-за меньшего количества побочных эффектов. Недавнее исследование показало, что это ПУВА-терапия может вызывать тошноту у пациентов, а также повышает риск развития онкологических заболеваний [11].

1.5 Процессы окисления птеринов

Нарушение меланогенеза ведёт к развитию ряда патологий, включая витилиго. Тетрагидробиоптерин ($H_4\text{Bip}$) в качестве кофермента фенилаланингидроксилазы участвует в окислении фенилаланина в тирозин (предшественник меланина). $H_4\text{Bip}$ легко окисляется кислородом *in vivo* и *in vitro*. У пациентов с витилиго наблюдается трёх-пятикратный *de-novo* синтез $H_4\text{Bip}$ и образующийся его избыток может подвергаться автоокислению. Автоокисление $H_4\text{Bip}$ является цепным процессом. На рисунке 3 представлены молекулярные продукты, образующиеся в процессе автоокисления $H_4\text{Bip}$ [13]. Первым молекулярным продуктом автоокисления $H_4\text{Bip}$ является хиноноидный 6,7-дигидробиоптерин ($qH_2\text{Bip}$) с временем жизни 1,5 минуты. Затем $qH_2\text{Bip}$ изомеризуется в более стабильный 7,8-дигидробиоптерин ($H_2\text{Bip}$) или трансформируется в 7,8-дигидроптерин ($H_2\text{Ptr}$) путём отрыва бокового радикала. $H_2\text{Ptr}$ легко окисляется кислородом до дигидроксантиоптерина ($H_2\text{Xap}$) и птерина (Pterin), а $H_2\text{Bip}$ окисляется до биоптерина (Bip).

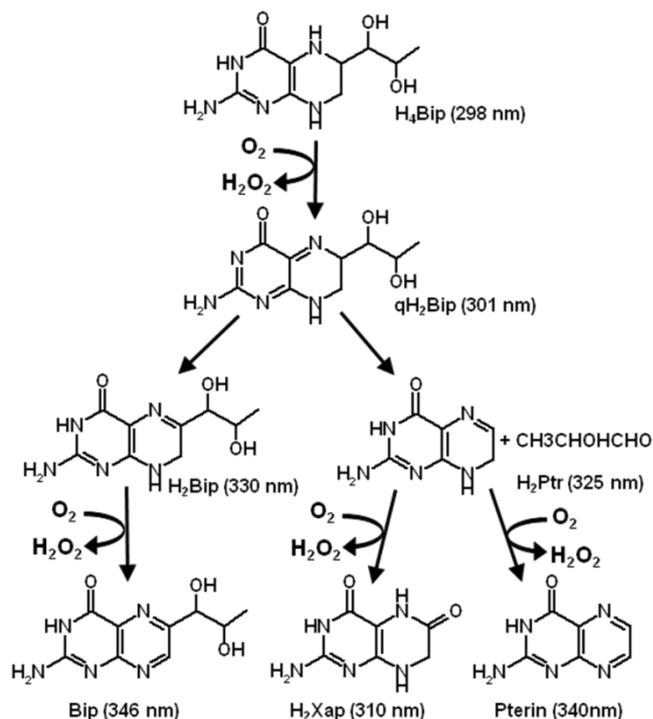


Рисунок 3 - Схема автоокисления тетрагидробиоптерина, в скобках длинноволновые максимумы в спектрах поглощения

Важным моментом является образование пероксида водорода H₂O₂ на каждом этапе окислительного процесса. Накопление H₂O₂ может приводить к формированию окислительного стресса. Есть гипотеза, что если H₄Bip окислять так, чтобы H₂O₂ не образовывалась, то можно уменьшить количество окислительных процессов и тогда ситуация нормализуется.

1.6 Кристаллы, активированные ионами Ce³⁺

Фторидные кристаллы с химическим составом LiMeF₄ (Me=Y, Lu) и LiMeAlF₆ (Me= Ca, Sr) применяют в качестве активных сред для получения лазерного излучения [14, 15].

Впервые лазерная генерация была получена в 1979 г. на кристалле $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$ на длине волны 325 нм при накачке эксимерным лазером KrF с длиной волны 249 нм [16]. В течение эксперимента характеристики лазерной генерации ухудшались и сильно зависели от деталей эксперимента. При небольшой плотности энергии и частоте следования импульсов больше 1 Гц лазер на кристалле $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$ уходил в насыщение, дальнейшее увеличение частоты следования импульсов приводило к уменьшению коэффициента усиления. Ухудшение параметров лазерной генерации объясняется двухступенчатой фотоионизацией иона-активатора, в результате которой образуются долгоживущие центры окраски. Время жизни центров окраски конечно. В случае, когда период следования импульсов накачки превышает время жизни центров окраски, происходит накопление наведенных центров. При длительном повторении количество центров окраски продолжает расти и способствует деградации лазерной генерации.

Далее в 1992 году была получена лазерная генерация на новой среде $\text{LiLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ на длине волны 311 нм при накачке эксимерным лазером KrF с длиной волны 249 нм. Порог лазерной генерации в $\text{LiLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ был в два раза ниже, чем в $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$, а частота следования импульсов превышала 10 Гц [17]. Все это может свидетельствовать о том, что в соответствующей активной среде поглощение на длине волны генерации отсутствует или существенно меньше, чем среде $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$. Также была получена генерация на длине волны 325 нм, но из-за коротковолнового излучения накачки в активной среде образовалась наведенная полоса поглощения. По форме и своему положению в спектре поглощения она напоминала полосу поглощения в кристалле $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$, но ее интенсивность была в два раза меньше.

Так же обнаружили свойства лазерной генерации у кристалла $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ в УФ области спектра [25], после этого было много исследований для выявления преимуществ данного твердотельного лазера и нахождение его применения [11,18-23]. В работе [26] добились выходных характеристик лазера УФ области, где активный элемент $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ накачивался излучением 4

гармоники лазера YAG:Nd с частотой 10 Гц, были достигнуты максимальная выходная энергия равная 1 мДж на длине волны 290 нм и КПД составлял 23%. На выходе WGF резонатор с активным элементом $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ дал возможность перестройки частоты от 280 до 330 нм, порог генерации соответствовал 1,6 мкДж, КПД – 25% [27].

Не менее интересные результаты были представлены в работе Castillo [28]. В работе исследовались серии образцов $\text{LiSr}_x\text{Ca}_{1-x}\text{AlF}_6$ активированные ионами Ce^{3+} , выращенные методом Чохральского, на поглощение и излучение, а также на лазерные свойства кристаллов. Максимальная выходная мощность в кристалле $\text{Li}(\text{Sr},\text{Ca})\text{AlF}_6$ при соотношении $\text{Sr}/\text{Ca} = 35/65$ с выходными зеркалами 10 и 30% прозрачности.

1.7 Межконфигурационные 5d-4f переходы ионов Ce^{3+}

Ce^{3+} имеет незаполненную 4f оболочку с одним электроном, поэтому имеет простую схему энергетических уровней и простой оптический спектр. Межконфигурационные переходы иона Ce^{3+} разрешены по четности. Они характеризуются большим сечением поглощения и излучения, а также малым временем релаксации [18]. Наличие спин-орбитального взаимодействия (СО взаимодействие) приводит к расщеплению терм ^2F и ^2D . На рисунке 4 приводится схема энергетических уровней, учитывая СО взаимодействие, с указанными энергетическими зазорами.

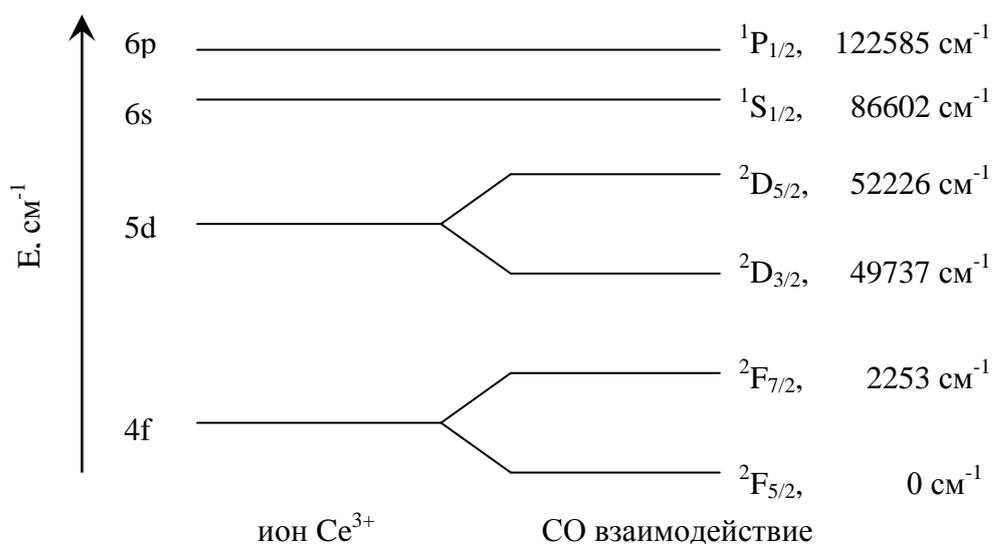


Рисунок 4 - Энергетические уровни свободного иона Ce^{3+} [18]

У иона Ce^{3+} энергия $4f^{n-1}-5d$ конфигурации минимальна, и составляет $E_{5d} < 50000 \text{ cm}^{-1}$ (рис. 4) для свободного иона. Так полосы поглощения и люминесценции его $4f-5d$ межконфигурационных переходов приходятся на УФ спектральную область. Из-за того, что свободный электрон церия при возбуждении переходит на внешнюю $5d$ оболочку, ион-активатор становится чувствительным к кристаллической решетке, в которую он помещается. Этим обусловлено изменение длин волн полос поглощения и люминесценции. Но помимо расщепления терм под действием CO взаимодействия, происходит расщепление на ряд штарковских компонентов под действием электрического поля окружения иона активатора. Для состояний ${}^2F_{7/2}$ и ${}^2F_{5/2}$, принадлежащих f -конфигурации штарковское расщепление мало ($\sim 100 \text{ cm}^{-1}$) в силу экранирования электронными оболочками других конфигураций. Для состояний ${}^2D_{5/2}$ и ${}^2D_{3/2}$ оно значительно больше и составляет $\sim 5000 \text{ cm}^{-1}$. Такое заметное расщепление приводит к тому, что полосы поглощения и люминесценция уширяются. Для большинства фторидных кристаллов, активированных ионами Ce^{3+} , самая низкоэнергетическая полоса поглощения и

полосы люминесценции находятся в диапазоне от 250 нм до 350 нм [19]. Также для этого иона характерна быстрая термализация электронов на $5d$ состоянии, и следовательно переходы являются эффективнее с более низкоэнергетического $5d$ состояния. Обобщая данный факт с относительно большим сечением поглощения, предстает возможность создания достаточной скорости накачки для возбужденного уровня церия с малым временем жизни.

Время жизни верхнего лазерного состояния мало, так как лазерная генерация реализуется на переходах, разрешенных по четности. Для кристаллов $\text{LiLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYF}_4:\text{Ce}^{3+}$ оно равняется 30 нс [19]. С другой стороны, известно о присутствии в этих кристаллах поглощения из возбужденного состояния [20]. Это негативно влияет на энергетические свойства активной среды. В основном, активированные церием фторидные кристаллы обладают близкими к органическим красителям в растворе характеристиками. Такие соответствия дают хорошие условия на возможность получения коротких импульсов за счет быстропротекающих процессов. Время жизни фотона в коротком (2-3 см) резонаторе может достигать сотен пикосекунд, что соизмеримо с длительностью импульса лазерной генерации.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Создание макетов лазеров УФ диапазона на активных средах $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$

Для изучения влияния на клетки излучения УФ диапазона спектра были собраны лазеры на активных средах $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$. На рисунках 5 и 6 представлены схемы реализованных установок.

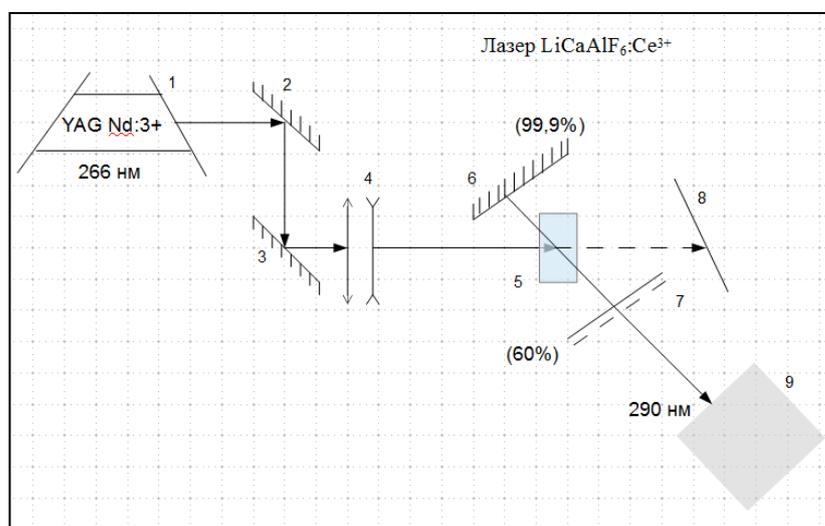


Рисунок 5 - Схема экспериментальной установки для исследования. 1 – лазер $\text{YAG}:\text{Nd}$ с длиной волны генерации 266 нм; 2,3,6,11 – «глухие» зеркала с коэффициентом отражения $R = 99,9\%$; 4 – телескоп, 5 – кристалл $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$; 7 – выходное зеркало резонатора с $R=60\%$, 9- прямоугольная призма, 10-собирающая линза, 12 - кристалл $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$, 13 – выходное зеркало с $R=26\%$

$\text{YAG}:\text{Nd}^{3+}$ -твердотельный лазер на алюмо-иттриевом гранате, активированном ионами неодима, включает в себя генераторы 2-й и 4-ой гармоник, генерирует лазерное излучение с длинами волн 266 нм и 532 нм. Спектроредитель отражает под углом 45° импульс с длиной волны 266 нм,

который попадает в телескоп (4). Он используется для повышения плотности энергии накачки внутри активного элемента $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$. Зеркала (6) и (7) образуют резонатор с кристаллом (5). Коэффициенты отражения зеркал резонатора подбираются с целью получения оптимума по энергии. Зеркало (8) возвращает прошедшую сквозь генерирующий кристалл (5) накачку обратно в него с целью повышения эффективности накачки.

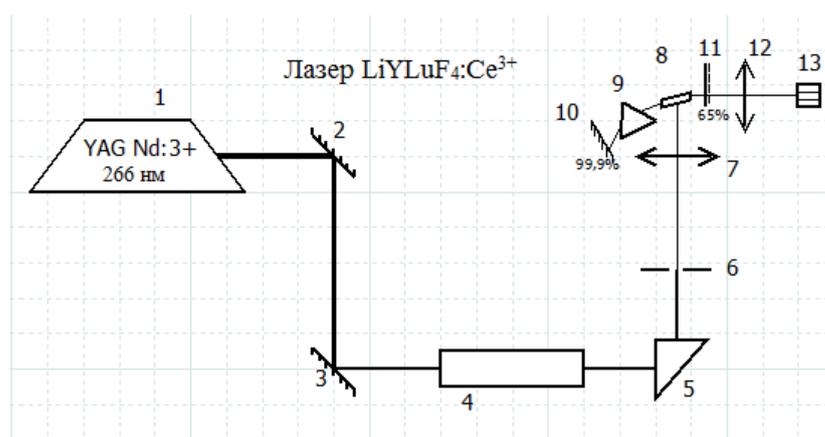


Рисунок 6 - Схема экспериментальной установки для исследования. 1 – лазер YAG Nd: 3+; 2,3,10 – «глухие» зеркала с коэффициентом отражения $R = 99,9\%$; 4 – ВКР преобразователь, 5- прямоугольная призма; 6- щель; 7,12- собирающие линзы; 8 – кристалл $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$; 9-треугольная призма; 11– выходное зеркало резонатора с $R=65\%$; 13-кювета

Резонатор для лазера на кристалле $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ собран следующим образом. Призма поворачивает излучение накачки на 90° , попадает на собирающую линзу (10), которая сжимает пятно импульса, что приводит к повышению плотности энергии. Зеркала (11) и (13) образуют плоскопараллельный резонатор с кристаллом (12), характерный размер резонатора сводится к минимальному и составляет 2,5 см. Длина резонатора укорачивается с целью уменьшения времени жизни фотона в резонаторе, что в свою очередь уменьшает длительность импульса. Увеличение потерь на выходном зеркале также влияет на уменьшение длительности импульса.

Отличие этих двух лазеров в том, что в случае $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ мы используем 60° призму, с помощью которой можем менять длину волны накачки.

2.2 Методика измерений

Для измерения длительности импульсов использовался четырехканальный осциллограф Tektronix DPO 7354 с полосой пропускания 3,5 ГГц в паре с лавинным фотодиодом с временной характеристикой спада 50 пс. Осциллограф обладает входными сопротивлениями 50Ω и $1\text{M}\Omega$, что позволяет согласовать сигнал с фотодиодом и получить высокое временное разрешение импульса при согласованном режиме. Также осциллограф имеет возможность сохранять форму импульса для дальнейшей её обработки. Для избавления от шумов использовалось усреднение сигнала. Количество импульсов, зафиксированных для усреднения, превышало 200.

Для измерения мощности использовался двухканальный измеритель мощности Ophir Pulsar-2, результаты измерения которого выводятся на ПК в специализированном интерфейсе. Данный детектор позволяет измерять энергию, мощность, а также частоту следования импульсов. Измерение энергетических характеристик производилось при синхронизации двух каналов, что приводит к более точным измерениям.

Измерения спектров поглощения и генерации производились на портативном спектрометре Solar laser systems S100. Данный спектрометр способен регистрировать свет в интервале длин волн от 190 нм до 1100 нм. Спектральные картины предоставляются в режиме реального времени на ПК в специализированном интерфейсе. Данный интерфейс позволяет сохранять спектральные картины для дальнейшей обработки.

Для исследования спектральных свойств раствора птерина была собрана установка, приведенная на рисунке 7.

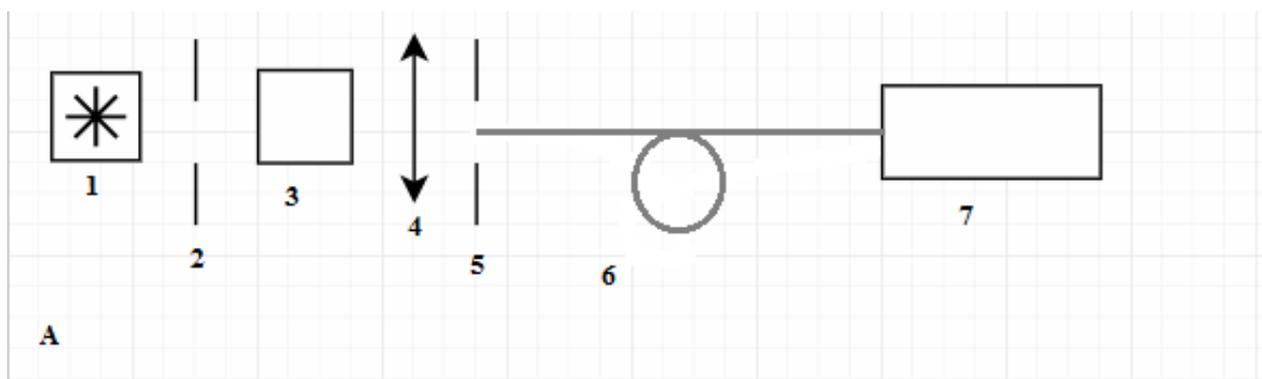


Рисунок 7 - Схема экспериментальной установки для исследования спектра поглощения; 1 - УФ лампа (StellarNet Inc., Deuterium+Halogen Lamps); 2, 5 - диафрагмы; 3 – кювета с раствором птерина; 4 – собирающая линза (коллиматор оптоволокна); 6 – оптоволокно(кварцевое); 7 – спектрометр (Solar S1000)

2.3 Культивирование клеток–фибробластов

Биологическую активность действия когерентного УФ излучения характеризовали при помощи культуры фибробластов кожи человека (HSF). Культура фибробластов получена из биопсии здорового донора и предоставлена НОЦ фармацевтики КФУ. HSF культивировали на среде DMEM, содержащей 20% эмбриональной сыворотки телят (HyClone, Австралия), 4мМ глутамин и 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Снятие клеток с культуральных флаконов совершали согласно Freshney [21]:

- 1) Удаляли аспирацией старую среду культивирования;
- 2) Промывали клетки фосфатным буфером (pH 7.2) (PBS);

- 3) Добавили в культуральный флакон раствор трипсина (0.25%) в количестве ~ 1 мл на 25 см²;
- 4) Помещали в термостат на 10 минут при 37°C, периодически аккуратно покачивая;
- 5) После отделения клеток от субстрата, добавляли полной среды и центрифугировали 1500 об/мин 5 мин при комнатной температуре (Eppendorf 5702 R). Осадок клеток ресуспендировали в небольшом объеме полной среды культивирования;
- 6) Подсчитывали клетки в камере Горяева.

На рисунке 10 представлены основные приборы и оборудование для культивирования клеток.

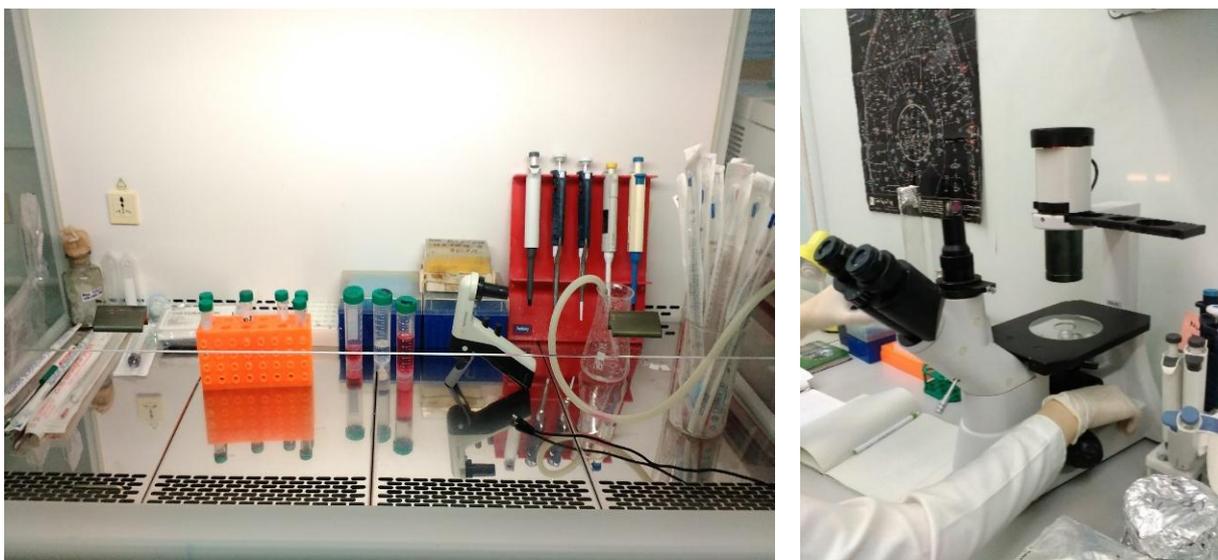


Рисунок 10 - Приборы для выращивания клеток и их анализа

Для характеристики биологической активности действия когерентного УФ излучения культуру клеток HSF снимали с поверхности культуральных сосудов при помощи трипсинизации (трипсин 0,25%, ПанЭко, Россия), ресуспендировали в среде культивирования и засевали в 96-луночные черные культуральные планшеты (SPL Life Sciences, Ю. Корея) в количестве $2 \cdot 10^4$

клеток/лунку. Объем среды в лунке составлял 150 мкл. Через сутки инкубации монослой клеток в лунках подвергали облучению в различных режимах.

2.4 Культивирование клеток–кератиноцитов

Первичные кератиноциты человека, предоставленные Институтом биологии развития РАН культивировали в среде СпТ-07 (CellnTec, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37⁰ во влажной атмосфере. При исследовании влияния когерентного ультрафиолетового излучения на жизнеспособность клеток, кератиноциты засеивали в предварительно коллагенированные черные 96-луночные культуральные планшеты (SPL, Южная Корея) в концентрации 2·10⁴ клеток/лунку. Снятие клеток с поверхности культуральных матрасов осуществляли при помощи 0,25% раствора трипсина (ПанЭко, Россия). Затем подвергали воздействию лазера на длине волны 310 нм в следующих режимах обработки: 0.3 мДж/см², 0.5 мДж/см², 1 мДж/см², 8.5 мДж/см² (сфокусированный луч). Время обработки каждой лунки составляло 10 мин. Непосредственно после облучения определяли долю жизнеспособных клеток в популяции кератиноцитов при помощи проточной цитометрии с использованием двойного окрашивания флуоресцентными красителями DiOC6 и йодидом пропидия [22]. Также фиксировали изменения выживаемости кератиноцитов через 24 ч после облучения при помощи МТТ теста согласно [23].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Оценка изменения жизнеспособности фибробластов кожи человека под действием когерентного излучения при помощи МТТ – теста

Оценку выживаемости клеток осуществляли после культивирования в течение 24 часов в присутствии наночастиц и после облучения с использованием МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США). Метод МТТ, впервые описан Mosmann [24]. В его основе лежит реакция восстановления желтой соли тетразолия МТТ митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана, которые нерастворимы в водной среде обитания клеток. Количество образовавшегося формазана пропорционально числу жизнеспособных клеток в лунке.

Клетки HSF засеивали в 96-луночные белые планшеты в количестве $2 \cdot 10^4$ клеток/лунку. На следующие сутки после посева облучали клетки УФБ излучением в разных режимах. Спустя 24 ч культивирования клеток в присутствии агентов и/или после облучения в лунки вносили по 5 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали в течение 3 ч. при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . По завершению инкубации среду из лунок аспирировали и вносили туда по 100 мкл диметилсульфоксида, чтобы растворить выпавший в осадок формазан, и измеряли при помощи планшетного ридера (Biorad, xMark, США) оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 307 нм и с разными длительностями импульса $t=0.3, 1, 2$ нс. Полученные результаты представлены на рисунке 11.

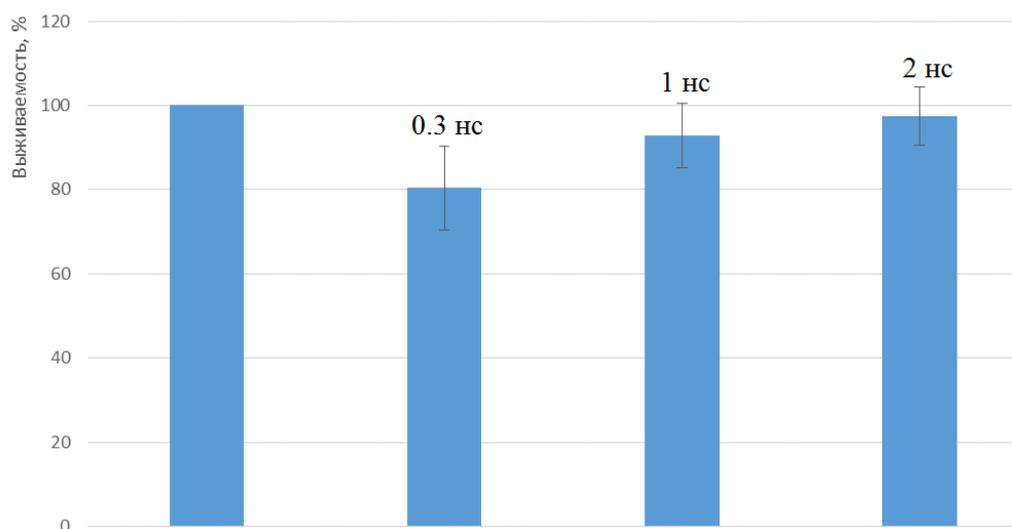


Рисунок 11 – оценка выживаемости фибробластов при воздействии излучением с длиной волны 307 нм в зависимости от длительности импульса

По данным, представленным на графике, видно, что при укорочении длительности импульса выживаемость уменьшается.

Так же проводили эксперименты с изменением длин волн (289 нм, 309 нм, 327 нм). При действии НИЛИ такого рода наблюдается незначительное снижение жизнеспособности клеток (Рисунок 12). Установлено, что выживаемость клеток HSF составила $93\pm 2\%$ и $92\pm 7\%$ при длине волны 289 нм и мощности излучения 42 мДж/см^2 и 200 мДж/см^2 , соответственно. Тогда как при обработке культуры клеток лазером с длиной волны 309 нм и мощностью излучения 20 мДж/см^2 и 30 мДж/см^2 выживаемость составила $103\pm 7\%$ и $93\pm 1\%$, соответственно. Достоверное отличие по сравнению с вариантом без обработки показано при облучении НИЛИ с длиной волны 289 нм (мощность излучения 42 мДж/см^2) и 309 нм (мощность излучения 30 мДж/см^2). Выживаемость клеток составила $93\pm 2\%$ и $93\pm 1\%$, соответственно. Для длины волны 327 нм при мощности излучения $5-7 \text{ мДж/см}^2$ и 35 мДж/см^2 отмечено увеличение жизнеспособности клеток и выживаемость составила $105\pm 16\%$ и $104\pm 15\%$.

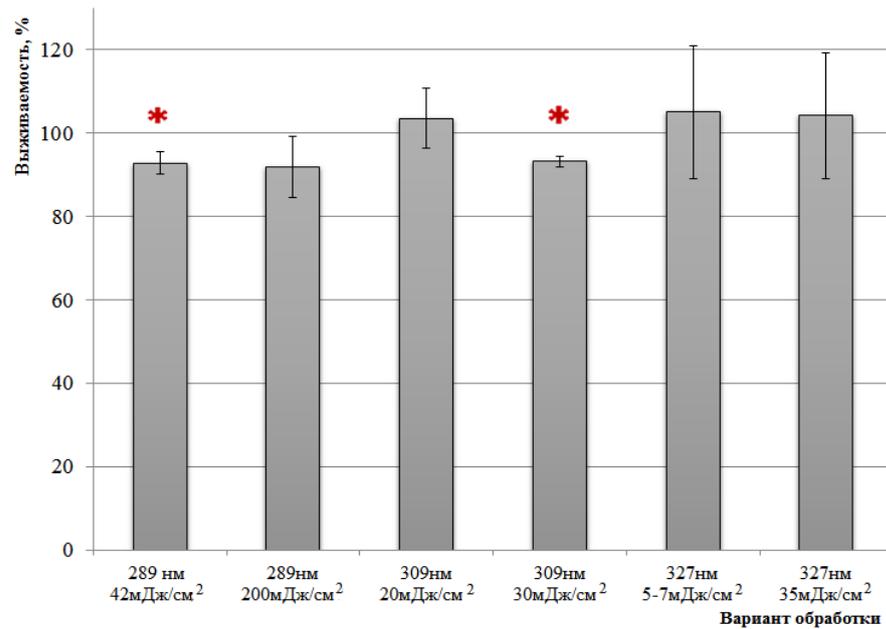


Рисунок 12 – Оценка влияния ультрафиолетового когерентного излучения лазера на активной среде Ce:LiCaAlF_6 с длинами волн 289 нм, 309 нм, 327 нм и разной мощностью (5-7 мДж/см² - 200 мДж/см²) на жизнеспособность фибробластов кожи человека. Время облучения 15 минут.; * - $p \leq 0.05$

Проведенное нами исследование позволяет сделать вывод, что выбранный диапазон длин волн (289 нм, 309 нм и 327 нм) и мощности излучения (5-7 мДж/см² - 200 мДж/см²) не оказывают существенного влияния на жизнеспособности фибробластов кожи человека, что подтверждает возможность их применения в низкоинтенсивной лазерной терапии при лечении дефектов кожи.

3.2 Оценка изменения жизнеспособности кератиноцитов кожи человека под действием когерентного излучения при помощи МТТ – теста

Результаты цитометрической оценки изменения доли жизнеспособных клеток кератиноцитов в популяции под действием лазерного излучения представлены на рисунке 13.

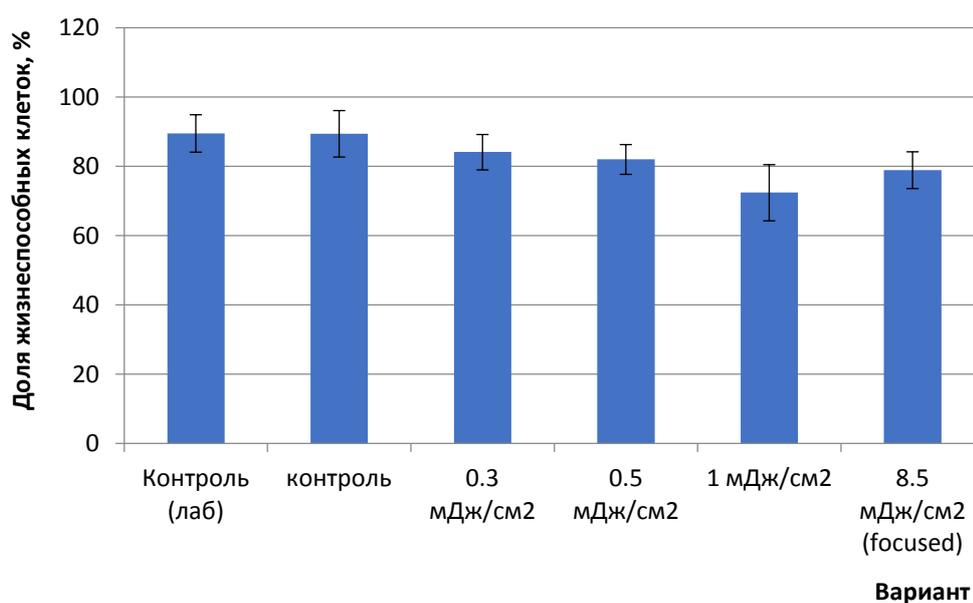


Рисунок 13 - Влияние режима обработки 310 нм лазером на жизнеспособность клеток первичной культуры кератиноцитов человека.

Контроль (лаб) – кератиноциты в идеальных условиях (в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ при 37⁰ во влажной атмосфере); контроль – кератиноциты в тестовом планшете без облучения; 0.3 мДж/см², 0.5 мДж/см², 1 мДж/см², 8.5 мДж/см² (сфокусированный луч) – варианты обработки. * - p < 0,05 при сравнении с вариантом «контроль»

Установлено, что доля жизнеспособных клеток в популяции кератиноцитов вариантах без обработки составляет 89,5%. При этом отсутствие существенной разницы между вариантами «Контроль (лаб)» и «Контроль»

свидетельствует об отсутствии негативного влияния изъятия культуры из инкубатора и перемещения в установку для облучения.

Увеличение мощности облучения понижало долю жизнеспособных клеток, однако достоверные различия (с вероятностью более 95 %) с вариантом без облучения проявились лишь при плотности энергии 8.5 мДж/см² (сфокусированный луч), когда доля жизнеспособных клеток снизилась до 72,4%. Повышение числа жизнеспособных клеток в популяции под действием фокусированного по центру лунки пучка с плотностью энергии 8.5 мДж/см² можно объяснить меньшей апертурой луча и повышенной выживаемостью клеток за пределами луча при таком варианте обработки.

Через 24 ч после эксперимента фиксировали изменения жизнеспособности кератиноцитов при помощи МТТ-теста (рисунок 14).

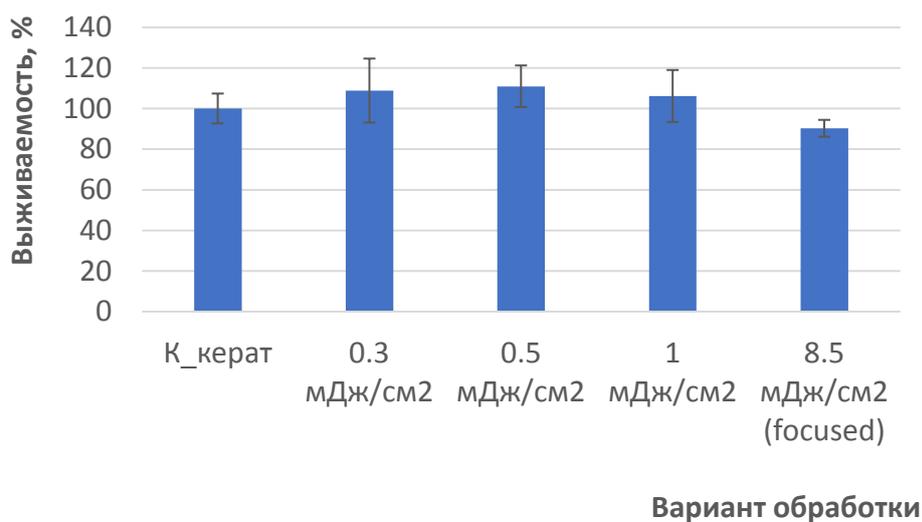


Рисунок 14 - Изменение выживаемости первичной культуры кератиноцитов человека под действием излучения лазера с длиной волны 310 нм. К-крат – вариант без обработки

Результаты МТТ-теста показали, что облучение УФ излучением в примененных условиях не изменяют выживаемость кератиноцитов. Лишь для наибольшей плотности энергии, использованной в эксперименте, заметно

небольшое уменьшение выживших клеток. Это означает, что исследованный нами диапазон плотностей энергии является безвредным по отношению к кератиноцитам.

3.3 Динамика окисления раствора птеринов

Был проведен эксперимент с белками птерина. На рисунке 15 и 16 видна его динамика при автоокислении (снят темновой спектр поглощения через 1 минуту) и фотоокислении (снят спектр поглощения под УФ облучением через 1 минуту).

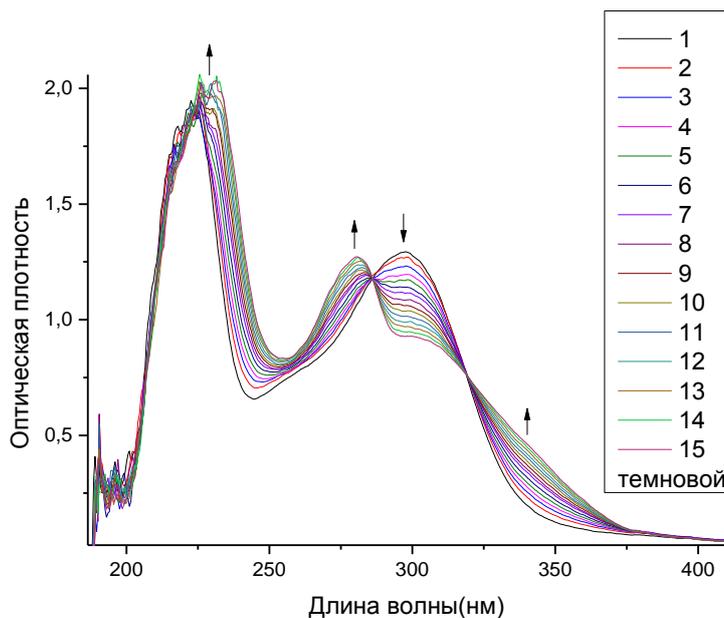


Рисунок 15- Динамика окисления раствора птеринов при автоокислении

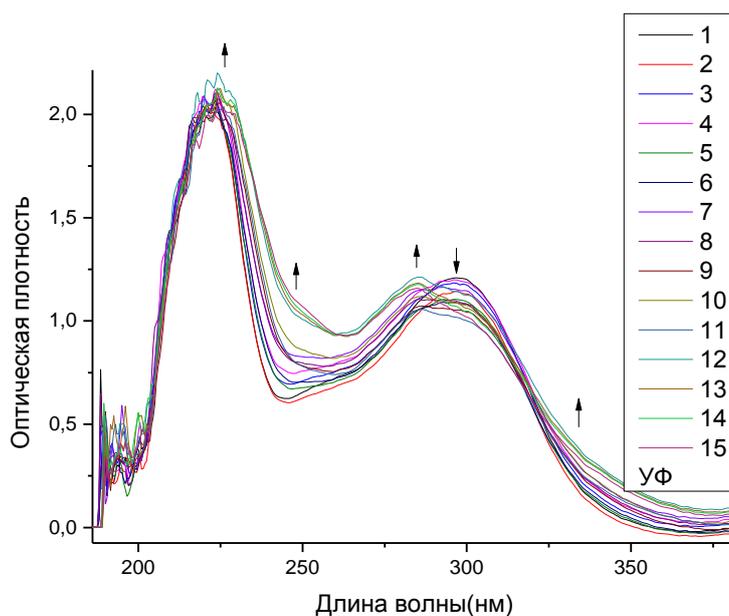


Рисунок 16 – Динамика окисления раствора птеринов при фотоокислении

Чтобы увидеть изменение количества веществ в результате облучения была построена динамика разностных спектров поглощения, результат приведен на рисунках 17 и 18.

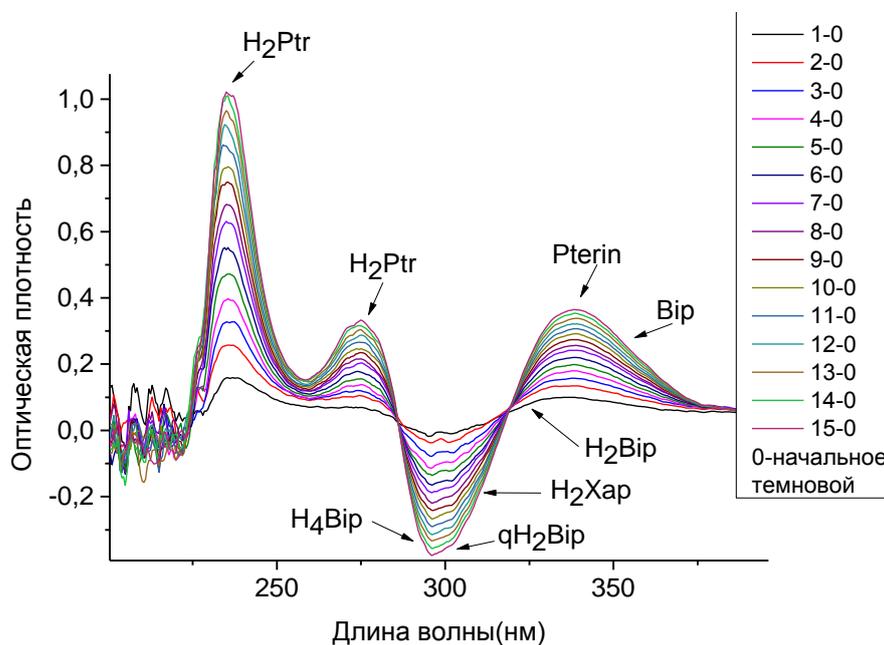


Рисунок 17 – Динамика разностных спектров поглощения раствора птеринов при автоокислении

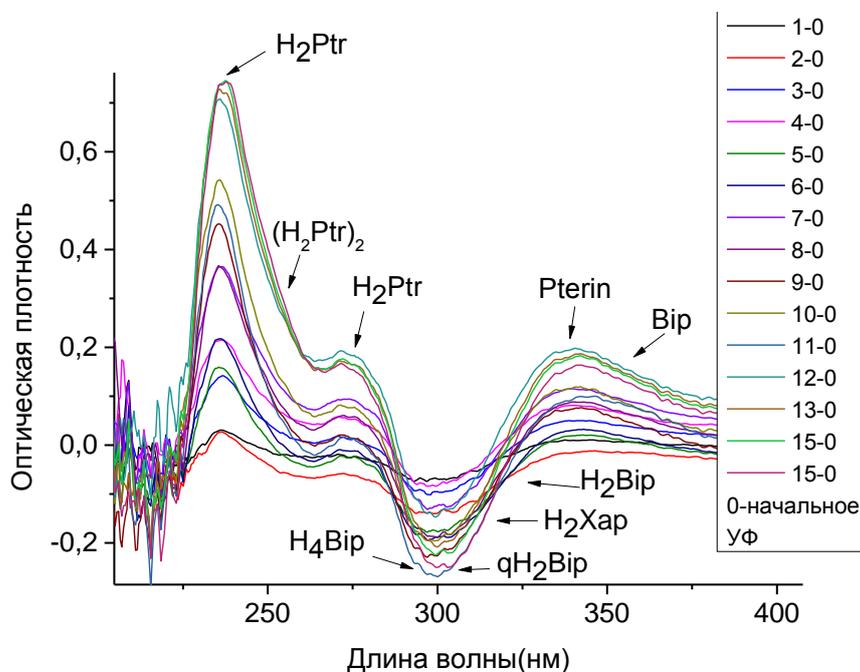


Рисунок 18 – Динамика разностных спектров поглощения раствора птеринов при фотоокислении

По спектрам можно увидеть полосы поглощения H_2Ptr (230 nm), плечо(275 nm), H_4Bip (298 nm), Pterin(340 nm), Bip(346 nm) и др..

Сравнение разности поглощения для процессов автоокисления и фотоокисления на 13 минуте представлено на рисунке (19).

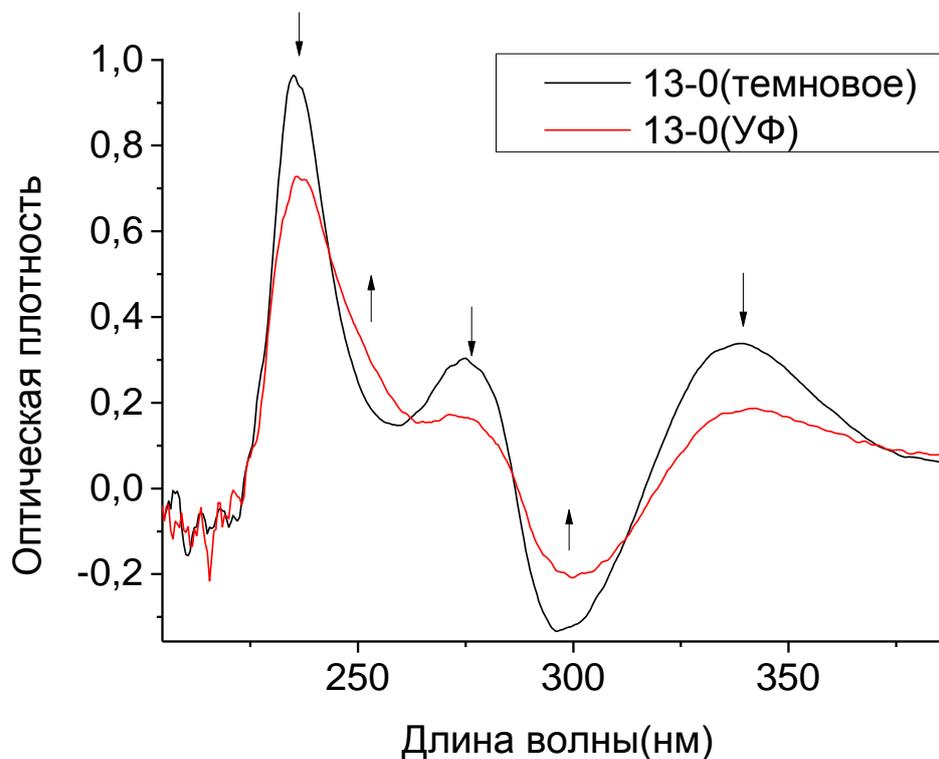


Рисунок 19 - Динамика при автоокислении и фотоокислении H_4Bip на 13 минуте

Для случая облучения УФ светом видно, что линия поглощения становится несимметричной, что способствует появлению полосы поглощения димеров дигидроптерина (H_2Ptr)₂ и дигидробиоптерина (H_2Bip)₂. Появление этих соединений как раз способствует уменьшению выхода пероксида водорода.

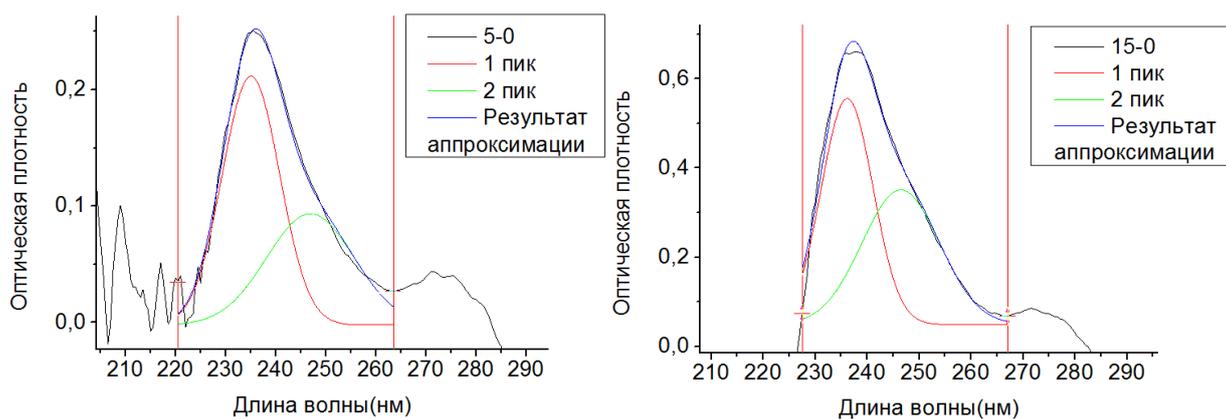


Рисунок 20 - Результат аппроксимации на 5 и 15 минуте

Линия поглощения около 240 нм для фотоокисления была аппроксимирована двумя гауссианами (рисунок 20) с центрами на длине волны 235 нм, дигидроптерин, и 246 нм, димер. Видно, что с увеличением экспозиции выход димера увеличивается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы, все поставленные задачи были решены:

1) Реализованы лазеры на активных средах $\text{LiCaAlF}_6:\text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ с длиной волны генерации 290 и 307 нм соответственно в импульсном режиме.

2) Культивированы клетки фибробластов, кератиноцитов и использованы молекулы белка птерина. Эти клетки облучены когерентным излучением УФ диапазона спектра.

3) Оценена жизнеспособность клеток кожи человека под действием когерентного излучения.

- Охарактеризовано токсическое действие когерентного УФ излучения твердотельного лазера на активной среде $\text{Ce}:\text{LiCaAlF}_6$ на культуру фибробластов кожи человека. Облучение в выбранном диапазоне длин волн (289 нм, 309 нм и 327 нм) и мощности излучения ($5 \text{ мДж/см}^2 - 200 \text{ мДж/см}^2$) не оказывает существенного влияния на жизнеспособность фибробластов кожи человека, что подтверждает возможность применения такой НИЛИ при лечении дефектов кожи.

- Облучение УФ светом при длине волны 307 нм с длительностями импульса (2 нс-0,3 нс) уменьшает выживаемость фибробластов.

- Облучение УФ светом при длине волны 310 нм с мощностями ($0,3 \text{ мДж/см}^2 - 8,5 \text{ мДж/см}^2$) не изменяет выживаемость кератиноцитов. Исследованный нами диапазон плотностей энергии является безвредным по отношению к кератиноцитам.

4) Исследована динамика фотоокисления птеринов. При облучении УФ светом происходит образование димеров дигидроптерина $(\text{H}_2\text{Ptr})_2$ и дигидробиоптерина $(\text{H}_2\text{Bip})_2$, что препятствует образованию пероксида водорода.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Оспанова, С.А. Методики фототерапии в дерматологии [Текст] / С.А. Оспанова, Р.М. Доцанова // Вестник КазНМУ. – 2013. – №2. – С.41.
- 2) Baron, E.D. Introduction to photobiology [Text] / E. D. Baron, A. K. Suggs // Dermatol Clin. – 2014. – V.32. – P. 255 – 266.
- 3) Weichenthal, M. Phototherapy: how does UV work? [Text] / M. Weichenthal, T. Schwarz // Photodermatol Photoimmunol Photomed. – 2005. – V.25. – P.260–266.
- 4) Bulat, V. The mechanisms of action of phototherapy in the treatment of the most common dermatoses [Text] / V. Bulat, M. Situm, I. Dediol // Coll Antropol. – 2011. – V.35. – P. 147–151.
- 5) Богатырева, В.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на живые клетки [Текст] / В.В. Богатырева // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2006. – №26. – С.10.
- 6) Генина, Э.А. Методы биофотоники: Фототерапия [Текст] / Э.А. Генина. – Саратов: Новый ветер, 2012. – 119 с. – ISBN 978-5-98116-149-0.
- 7) Mehraban, S. 308 nm excimer laser in dermatology [Text] / S. Mehraban, A. Feily // J Lasers Med Sci. – 2014. – V.5. – P. 8–9.
- 8) Menta, D. Ultraviolet B Phototherapy for Psoriasis: Review of Practical Guidelines [Text] / D. Menta, H.W. Lim // Am J Clin Dermatol. – 2016. – V. 17. – P. 125–126.
- 9) Vangipuram, R. Ultraviolet phototherapy for cutaneous diseases: a concise review [Text] / R. Vangipuram, S.R. Feldman // Oral Diseases. – 2016. – V.22. – P. 253–259.
- 10) Kollner, K. Comparison of the 308-nm excimer laser and a 308-nm excimer lamp with 311-nm narrowband ultraviolet B in the treatment of psoriasis [Text] / K. Kollner, M.B. Wimmershoff, C. Hintz, M. Landthaler, U. Hohenleutner // British Journal of Dermatology. – 2005. – V.152. – P. 753.
- 11) Babino, G. UVA1 Laser in the Treatment of Vitiligo [Text] / G. Babino, A. Giunta, M. Esposito, R. Saraceno, A. Pavlidis, E. Duca, S. Chimenti, S. Paul // Photomedicine and Laser Surgery. – 2016. – V.34. – № 5. – P. 1.

- 12) Casacci, M. Comparison between 308-nm monochromatic excimer light and narrowband UVB phototherapy (311–313 nm) in the treatment of vitiligo – a multicentre controlled study [Text] / M. Casacci, P. Thomas, A. Pacifico, A. Bonnevalle, A. Vidolin, G. Leone // JEADV. – 2007. – V.21. – P.956-957.
- 13) Davis, M. D. The auto-oxidation of tetrahydrobiopterin/ M. D. Davis, S. Kaufman, S. Milstein// Eur. J. Biochem., 1988, V. 173, P. 345–351.
- 14) Никанович, М.В. Радиационные центры окраски в кристалле LiLuF₄/ М.В. Никанович, А.П. Шкадаревич, Ю.С. Типено, С.В. Никитин // ФТТ. – 1988. – Т.30. - № 6. – С. 1861-1863.
- 15) Combes, C. M. Optical and scintillation properties of pure and Ce 3+-doped Cs₂LiYCl₆ and Li₃YCl₆: Ce 3+ crystals / C. M. Combes //Journal of Luminescence. – 1999. – Т. 82. – №. 4. – С. 299-305.
- 16) Ehrlich, D. J. Ultraviolet solid-state Ce: YLF laser at 325 nm / Ehrlich D. J., Moulton P. F., Osgood R. M. //Optics letters. – 1979. – Т. 4. – №. 6. – С. 184-186.
- 17) Laroche, M. Beneficial effect of Lu³⁺ and Yb³⁺ ions in UV laser materials/ M. Laroche, S. Girard, R. Moncorge, M. Bettinelli, R. Abdulsabirov, V. Semashko// Optical Materials. – 2003. – V. 22. – P. 147–154.
- 18) Brewer, L. Energies of the electronic configurations of the singly, doubly and triply ionized lanthanides and actinides / L. Brewer // JOSA. – 1971. – V. 61., № 12. – P. 1666–1682.
- 19) Dieke, G. H. The spectra of the doubly and triply ionized rare earths / G. H. Dieke, H. M. Crosswhite// Appl.Opt. – 1963. – V.2., № 7. – P. 675–686.
- 20) Nizamutdinov, A. S. Optical and gain properties of series of crystals LiF–YF₃–LuF₃ doped with Ce 3+ and Yb 3+ ions / Nizamutdinov A.S., Semashko V.V., Naumov A.K., Korableva S.L., Abdulsabirov R.Y., Polivin A.N., Marisov M.A. // Journal of luminescence – 2006. V127(1), P.71–75.
- 23) Аникина, Л.В. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина [Текст] / Л.В. Аникина, С.А. Пухов, Е.С. Дубровская, С.В. Афанасьева, С.Г. Клочков // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12-7. – С. 1423–1427.

- 21) Freshney, R. I. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques [Text] / R. I. Freshney // 3rd ed. Wiley – Liss. – 1993. – P. 10-12.
- 22) Zelenikhin, P.V. Binase-Induced Changes of Tumor Cell Membranes/ P.V. Zelenikhin, A.S. Gorbunova, K. Beuerlein, A.V. Makeeva, O.N. Ilinskaya // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2018. – V.73, Is.1. – P.7–12.
- 24) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay [Text] / T. Mosmann // J. Immunol. Meth. – 1983. – V. 65. – P. 55–63.
- 25) Dubinskii, M. A. Ce³⁺-doped colquiriite: A new concept of all-solid-state tunable ultraviolet laser / M. A. Dubinskii, V. V. Semashko, A. K. Naumov, R. Yu. Abdulsabirov, S. L. Korableva // Journal of Modern Optics. – 1993 – V. 40 – №. 1 – P. 1–5.
- 26) Pham, M. H. Laser quality Ce³⁺: LiCaAlF₆ grown by micro-pulling-down method / M.H. Pham et al // Japanese Journal of Applied Physics. – 2008 – T. 47 – №. 7R. – C. 5605.
- 27) Thanh, L. Low-threshold ultraviolet solid-state laser based on a Ce³⁺: LiCaAlF₆ crystal resonator/ L.Thanh, S.Schowalter et al// OPTICS LETTERS. – 2012 – V.37. – P.4961–4963.
- 28) Castillo, V. K. Material and laser characterization of Ce, Na: LiSr_xCa_{1-x}AlF₆ compounds/ V. K. Castillo, G. J. Quarles, R. S. F. Chang // Laser Crystals, Glasses, and Nonlinear Materials Growth and Characterization. – International Society for Optics and Photonics, 2003 – T. 4970 – C. 22–35.