

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

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 – «Физика»

Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**«Исследование влияния длительности лазерных импульсов
ультрафиолетового диапазона спектра на клетки фибробластов»**

Студентка 2 курса группы 06-919

«16» июня 2021 г.



(Хамдан Я.М.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

«16» июня 2021 г.

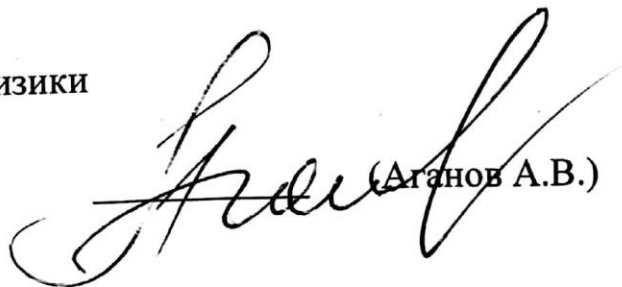


(Низамутдинов А.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«16» июня 2021 г.



(Аганов А.В.)

Казань-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Лазеры	5
1.1.1 История Лазера.....	5
1.1.2 Параметры лазера и лазерные системы (непрерывные и импульсные)	7
1.1.3 Взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями	8
1.1.4 Механизмы взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями	9
1.1.5 Медицинское применение лазеров	10
1.1.6 Лазеры в дерматологии	13
1.2 Влияние ультрафиолетового лазерного излучения на клетки фибробласты.....	14
1.2.1 Низкоуровневая лазерная терапия (НИЛИ).....	14
1.2.2 Ультрафиолетовая (УФ) фототерапия	16
1.2.3 Влияние ультрафиолетовых лучей на клетки	17
2. НАКОЖНАЯ БОЛЕЗНЬ ВИТИЛИГО	20
2.1 Ближний диапазон УФВ эффективность.....	23
2.1.1 Механизм действия NB-UVB на пациентов с витилиго	27
2.1.2 Эксимерный лазер 308 нм	28
2.1.3 Побочные эффекты	29
2.1.4 Комбинированная терапия	30
2.1.4.1 Механизм действия.....	31
3. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	32
3.1 Создание макетов лазеров УФ диапазона на активных средах $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}^{+3}\text{Yb}$	32
3.2 Методика измерений.....	39
3.3 Культивирование клеток фибробластов	40
4. РЕЗУЛЬТАТЫ	42
ВЫВОДЫ.....	45

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ.....	46
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	47

ВВЕДЕНИЕ

В медицине достаточно давно применяется низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ). Его основные эффекты клинически описаны, к ним можно отнести противовоспалительный и стимулирующий. На данный момент не существует общей теории, которая объясняет системное действие низкого интенсивного лазерного излучения, но все эти подходы успешно применяются в терапии патологий кожи, как витилиго и псориаз [1].

Одним из наиболее актуальных направлений фототерапия является лечения псориаза и витилиго. Исследованиями доказано, что активный лечебный спектр ультрафиолетовых лучей расположен в диапазоне от 296 до 313 нм [2]. Особый научный интерес представляет характеристика действия когерентного излучения на жизненные показатели клеток фибробластов и кератиноцитов. Фибробласты- эти клетки соединительной ткани организма, синтезирующие внеклеточный матрикс, а кератиноциты- эти основные клетки эпидермиса кожи человека (которые составляют примерно 90% всех клеток эпидермиса). Изменения параметров жизнедеятельности этих клеток происходят при развитии многих патологий.

Исходя из вышесказанного целью настоящей работы было исследование влияния длительности лазерных импульсов ультрафиолетового диапазона спектра на клетки фибробластов. В работе был собран лазер на активной среде $\text{LiLu}_{0.7}\text{Y}_{0.3}\text{F}_4:\text{Ce}^+\text{Yb}$ с возможностью использования двух вариантов длительности импульса, 10 нс и 1 нс [3]. Резонатор лазера был организован двумя плоскими зеркалами (99,9% и 25-% отражения в диапазоне 270–320 нм). Малая длина (25 мм) и значительные выходные потери вместе

определяют низкую добротность лазерного резонатора, а время жизни фотона (τ_c) в резонаторе составляло около 300 пс.

Измерения формы импульса проводились с помощью фотодиодов Alphas с временем спада 50 пс, подключенных к осциллографу Род Шварц с полосой пропускания 1 ГГц.

Методы, используемые для достижения целей работы и оценки воздействия на клетки фибробластов – это методы изучения биомеханики клеток: МТТ-тестирование, проточная цитометрия и методика культивирования фибробластов. В работе представлены результаты исследования воздействия облучения культур фибробластов лазерным излучением ультрафиолетового диапазона с различной длительностью импульса и на различных длинах волн, в том числе выживаемости, обсуждаются возможные механизмы влияния такого УФ облучения на клетки фибробластов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лазеры

1.1.1 История Лазера

Со времени первого доклада Маймана (1960) о лазерном излучении были исследованы многие потенциальные области его применения. Среди них медицинская лазерная хирургия, безусловно, относится к наиболее значительным достижениям нашего столетия. Фактически, различные виды лазеров уже стали незаменимыми инструментами современной медицины. Хотя клиническое применение сначала ограничивалось офтальмологией, наиболее впечатляющей и сегодня хорошо зарекомендовавшей себя лазерной хирургией является лазерная коагуляция с использованием иона аргона в случае отслоения сетчатки. Тем временем области медицинского лазерного лечения значительно расширились. С исторической точки зрения, лазеры впервые были применены в офтальмологии. Это было очевидно, так как глаз и его внутреннее пространство относятся к наиболее легкодоступным органам из-за их высокой прозрачности. А Мейер-Швикерат (1956) успешно исследовал коагуляционное действие ксеноновых импульсных ламп на ткань сетчатки. В 1961 году, всего через год после изобретения лазера, первые экспериментальные исследования были опубликованы Зарет (1961). Вскоре после этого пациенты с отслоением сетчатки уже получали лечение, как сообщили Кампбэл (1963) и Цвенг и др. (1964). В то же время исследования в стоматологии впервые провели Голдман (1964) и Стерн и Согнес (1964). Вначале лазерное лечение ограничивалось применением

рубиновых лазеров. Позже последовали и другие типы лазеров. И, соответственно, клинические исследования расширены в рамках дисциплин офтальмологии и стоматологии. Термин «лазер» является аббревиатурой от усиления света за счет вынужденного излучения. Однако теперь он расширился до термина «лазерная генерация», глагола, обозначающего лазерное воздействие. Я считаю, что изобретение лазеров входит в десятку самых значительных изобретений 20 века. С момента первой демонстрации действия лазера в 1960 году лазеры обогатили все аспекты жизни:

от сканеров в продуктовых магазинах, которые считывают цену товара на этикетке со штрих-кодом, до компакт-дисков и DVD-дисков для домашних развлечений, красочных лазерных световых дисплеев в ночных клубах, лазерной хирургии и лазерного лечения рака (фотодинамической терапии). История развития лазеров столь же красочна. Таунс и Шаллоу теоретически предложили концепцию конструкции и действия лазера в 1958 году и придерживаются патент на это. Однако первый лазер не был разработан до 1960 года, когда Майман продемонстрировал рубиновый лазер. Для многих приложений биофотоники лазер - это просто интенсивный источник света. Но Лазер - это:

- Монохроматический (один цвет или длина волны)
- Направленный луч с малой расходимостью.

Способен сосредоточиться на очень маленьком пятне

- Способен производить короткие вспышки света очень высокой интенсивности (менее триллионной секунды)

Поэтому во многих приложениях для удобства и эффективности используется лазерный источник, хотя вместо него можно использовать обычную лампу. Лазеры обладают уникальной способностью генерировать когерентный световой луч и

ультракороткие импульсы (от 9–10 до 10–15 секунд, то есть от наносекунд до фемтосекунд). Многие приложения становятся возможными благодаря использованию этих уникальных свойств лазерного луча. Недавние разработки в лазерной технологии позволили создать очень компактные и энергоэффективные твердотельные лазеры, которые можно легко интегрировать с эффективными системами доставки (такими как оптические волокна) к тканям или использовать эндоскопически с минимально инвазивным подходом к определенному участку живого объекта. Эти разработки еще больше расширили возможности оптического зондирования на основе света и лечения на основе света. Свойства лазеров также делают их уникальными для создания нелинейных оптических эффектов. Легкость, с которой могут быть получены эти нелинейные оптические эффекты, дала новый импульс биофотонике, создав новые подходы к оптической визуализации, зондированию и диагностике, а также новые методы лазерного лечения и терапии.

1.1.2 Параметры лазера и лазерные системы (непрерывные и импульсные)

Что важно, наши потребности в параметрах лазера варьируются в зависимости от целевой области лечения. Определенно не существует единого эталонного значения для всех типов лазерных процедур. Точно так же, как технолог, основанный на хирургии глаза с использованием LASIK или фемтосекунды, имеет эталонные значения, специфичные для этой операции, и они также могут отличаться от одного человека к другому в зависимости от состояния болезни, по той же концепции, также и технолог, который контролирует параметры лазера в сеансе лечения для рак, например,

имеет разные ценности и разные соображения. Однако параметры лазера одинаковы, даже если значения разные. Есть несколько способов классифицировать лазеры, мы здесь наиболее осведомлены о режиме работы. Лазер может быть непрерывно-волновым или импульсным. К лазерам непрерывной волны относятся газовые лазеры и твердотельные лазеры. Где эксимерные лазеры и лазеры на красителях и в основном твердотельные лазеры работают как импульсные лазеры [4].

1.1.3 Взаимодействие лазерного излучения с биологическими тканями

Когда речь идет о взаимодействии лазера с тканью, необходимо знать многие вещи. Взаимодействие света на молекулярном уровне, вызывающее поглощение, спонтанное излучение, вынужденное излучение и комбинационное рассеяние света. Затем взаимодействие на объемном уровне, вызывающее поглощение, преломление, отражение, и рассеяние при распространении света через массивный образец. Различные фотофизические и фотохимические процессы, происходящие в возбужденное состояние, которое создается поглощением света. Основное направление взаимодействия света и материи - спектроскопия, который включает изучение перехода между квантованными уровнями [5].

1.1.4 Механизмы взаимодействия лазерного излучения с биологическими тканями

Разнообразие механизмов взаимодействия, которые могут возникнуть при воздействии лазерного света на биологическую ткань, разнообразно. Этому разнообразию способствуют особые характеристики тканей, а также параметры лазера. Наиболее важными среди оптических свойств ткани являются коэффициенты отражения, поглощения и рассеяния. Вместе они определяют полное пропускание ткани на определенной длине волны. Также учитываются термические свойства ткани, такие как теплопроводность и теплоемкость. С другой стороны, следующие параметры задаются самим лазерным излучением: длина волны, время экспозиции, приложенная энергия, размер фокального пятна, плотность энергии и плотность мощности. Среди них время экспозиции очень важный параметр при выборе определенного типа взаимодействия. В течение первых десятилетий после изобретения лазера Майманом (1960) было проведено множество исследований по изучению потенциальных эффектов взаимодействия с использованием всех типов лазерных систем и тканевых мишеней. Хотя количество возможных комбинаций экспериментальных параметров неограничено, в основном [6]. Сегодня классифицируются пять категорий типов взаимодействия. Это фотохимические взаимодействия, тепловые взаимодействия, фотоабляция, плазменная абляция и фоторазрушение. В частности, рассматриваются физические принципы, регулирующие эти взаимодействия. Особое внимание уделяется микроскопическим механизмам, управляющим различными процессами преобразования энергии лазера. Все эти, казалось бы, разные типы взаимодействия

имеют одну общую основу: характеристику плотность энергии колеблется от примерно 1 Дж / см² до 1000 Дж / см² [7].

1.1.5 Медицинское применение лазеров

Применение лазера в лечении основано на взаимодействии лазерного излучения с биологической тканью. Лазерное излучение можно отнести к большой категории электромагнитного излучения, генерируемого многими типами источников излучения, такими как солнце, огонь, лампочки, электрический разряд, плазма и т. Д. С исторической точки зрения солнечное излучение использовалось в качестве лечебное средство для лечения различных патологических явлений или улучшения здоровья на многие века. Считается, что древние египтяне использовали «солнечные ванны» в качестве фототерапии, а древние греки и римляне использовали солнечный свет для фототерапии или гелиотерапии (Bertolotti, 2005). Солнечное излучение также инициировало действие светочувствительных веществ, нанесенных на кожу, что приводило к заживлению определенных тканей [8].

Египтяне и индийцы лечили кожные заболевания, такие как витилиго или лейкодермия, с помощью этого метода, который сегодня называется фотохимиотерапией. Китайцы исторически использовали солнце для лечения (или, по крайней мере, замедления) развития таких заболеваний, как рахит, рак кожи или даже психоз. В средние века использование света для лечения было прервано, возможно, из-за средневековой морали, запрещающей публичное обнажение [8]. В конце девятнадцатого века швейцарский целитель Арнольд Рикли вновь познакомил медиков с положительным воздействием солнечного света и использовал эти эффекты как

основу успешных естественных методов лечения. Луи Кун и Генрих Лахман также использовали гелиотерапия для лечения некоторых заболеваний. Значительную работу в области фототерапии проделал датский врач Нильс Рибберг Финсен. Вскоре после открытия лазера на неодимовом стекле его излучение в ближней инфракрасной области (ИК) впервые было использовано для лечения. Для людей с диабетом значительное развитие произошло в 1968 году, когда Ф. Л'Эсперанс, Э. Гордон и Э. Лабуда успешно использовали аргоновый ионный лазер для лечения диабетической ретинопатии (Л'эсперанс, 1969; Л'эсперанс and Е. Джеймс, 1981). Этот лазер имеет и другие потенциальные применения для удаления пятен от портвейна. Также были проведены исследования по возможному лечению сосудистых мальформаций с помощью технологии аргонового лазера.

Открытие в 1964 году лазеров на CO_2 и Nd: YAG также имело большое значение для медицины. Эти два лазера работают в ближней ИК (Nd: YAG) и дальней ИК (CO_2) областях спектра и до настоящего времени были наиболее распространенными лазерными устройствами в медицинской практике. Было обнаружено, что лазерный луч Nd: YAG и CO_2 может разрезать ткань как скальпель, но с минимальной кровопотерей. Использование расфокусированного луча создает возможность для пятна большего размера, что делает возможным гемостаз. Это сделало лазеры на Nd: YAG и CO_2 полезным инструментом в хирургии сосудистых органов, таких как печень, слизистая оболочка полости рта и гинекологические ткани. Хирургическое использование CO_2 – лазеров широко исследовалось с 1967 по 1970 гг. Такими первопроходцами, как Т. Польяния и Дж. Джако, а использование CO_2 – лазера в отоларингологии и гинекологической хирургии получило широкое распространение в начале 1970-х годов. Успехи в

этой области были также сделаны В. К. Райтом и И. Капланом, которые разработали применение СО 2 – лазеров в общей хирургии (РАЙТ, 1982; Каплан, 1984). Вместе с открытием новых типов лазеров разработка новых способов использования лазеров повлияла на открытие новых медицинских методов лечения. В 1962 г.

Хеллварт и МакКланг открыли возможность генерации коротких импульсов длительностью в десятки наносекунд (9– 10 нс), которые обеспечивали гораздо более высокую мощность лазера, чем те, что были доступны ранее. Поэтому эти импульсы были названы «гигантскими» импульсами (Гелворт и МакКланг, 1962).

Лазерные импульсы, включающие как высокие уровни мощности, так и искры, генерируемые в ткани, впоследствии были использованы в офтальмологии для удаления вторичной катаракты (Краснов, 1975; Фанхаусэр, 1982). Когда появились еще более короткие импульсы в диапазоне пикосекунд (10 – 12 пс) (Денис 1972), они использовались для той же цели (Арон-Роса, 1980). Последние разработки привели к генерации фемтосекундных импульсов (10 – 15 фс), которые используются в офтальмологии для изменения формы роговицы. В двадцать первом веке полупроводниковые лазеры используются в медицине, где их небольшие размеры и компактность являются преимуществом. В связи с развитием такого количества типов лазеров важно выбрать лазер с оптимальными параметрами излучения для конкретного лечения ткани. Неправильный выбор лазера может привести к нулевым результатам или даже к повреждению тканей. Следовательно, необходимы фундаментальные знания лазерных технологий, прежде чем лазер будет выбран для конкретного лечения. После 58 лет применения лазерного излучения в медицине фон взаимодействия излучения с тканями в некоторой степени выяснен.

1.1.6 Лазеры в дерматологии

В дерматологии широко используются тепловые эффекты лазерного излучения, особенно коагуляция и испарение. Поскольку оптические параметры кожи, т.е. поглощение и рассеяние, сильно зависят от длины волны, различные виды реакции тканей могут быть вызваны различными лазерными системами. В клинической практике в настоящее время используются в основном пять типов лазеров: лазеры на ионах аргона, красители. лазеры, CO₂- лазеры, Nd: YAG-лазеры и рубиновые лазеры. Кожа в основном состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожного слоя. Внешний два слоя - эпидермис и дерма – вместе образуют кутис. Эпидермис содержит так называемые кератоциты и меланоциты, которые производят кератин и меланин соответственно. И кератин, и меланин являются важными защитными белки кожи. Большая часть дермы представляет собой полутвердую смесь коллагена. волокна, вода и высоковязкий гель, называемый основным веществом. Комплекс природа кожи создает замечательную ткань с очень высокой прочностью на разрыв которые могут противостоять внешнему сжатию, но в то же время остаются гибкими. Кровеносные сосуды, нервы и рецепторы в основном расположены в подкожной клетчатке и дерма. В микроскопическом масштабе граница раздела воздух-кожа довольно грубая и поэтому рассеивает падающее излучение. Поглощение света хромофорами такими поскольку гемоглобин или меланин придают коже уникальный цвет. Оптическое рассеяние на коллагеновые волокна в основном веществе во многом определяют, какая доля падающий свет проникает в соединительные ткани. Подробные

исследования относительно оптические параметры кожи были выполнены Граф (1993b).

1.2 Влияние ультрафиолетового лазерного излучения на клетки фибробласты

1.2.1 Низкоуровневая лазерная терапия (НИЛИ)

Предыдущие исследования показали, что лазер может избирательно влиять на биологические функции клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Низкоуровневая лазерная терапия (НИЛИ) - это форма фототерапии, которая включает использование когерентного, монохроматического, низкоэнергетического света для травм и поражений, чтобы стимулировать заживление [9]. Использование этого лечения для облегчения боли и ускорения заживления неизлечимых пятен является важным событием. Чтобы обеспечить такое лечение, необходимо оценить изменения морфологии клеток-мишеней. Необходимо оценить такие параметры клеток, как пролиферация, жизнеспособность клеток и цитотоксичность [10]. Не менее важна оценка молекулярных параметров, таких как степень повреждения ДНК. НИЛИ, фототерапия или фотобиомодуляция относятся к использованию фотонов нетеплового излучения для изменения биологической активности. LLLT использует либо когерентные источники света (лазеры), либо некогерентные источники света, состоящие из фильтрованных ламп или светоизлучающих диодов (LED), или, в некоторых случаях, их комбинацию. Основными медицинскими применениями НИЛИ являются уменьшение боли и воспаления, усиление восстановления тканей и стимулирование регенерации различных тканей и нервов, а

также предотвращение повреждения тканей в ситуациях, когда это может произойти. В последние несколько десятилетий неабляционный лазер методы лечения все чаще используются для эстетического лечения мелких морщин, фотостарения кожи и шрамов - процесса, известного как фотоомоложение . Совсем недавно этот подход использовался также при воспалительных акне.

Недавно было обнаружено, что лечение НИЛИ с различной интенсивностью стимулирует или ингибирует ряд клеточных процессов. Механизм, связанный с фотобиостимуляцией клеток с помощью НИЛИ, еще полностью не изучен. Наблюдения показывают, что НИЛИ оказывает широкий спектр эффектов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях [11].

Считается, что основным биологическим механизмом, лежащим в основе эффектов НИЛИ, является поглощение света митохондриальными хромофорами, в частности цитохром-с-оксидазой (ССО), которая содержится в дыхательной цепи, расположенной в митохондриях, и, возможно, также фотоакцепторами в митохондриях. плазматическая мембрана клеток. Следовательно, в митохондриях происходит каскад событий, ведущих к биостимуляции различных процессов. Спектры поглощения, полученные для ССО в различных состояниях окисления, были записаны и оказались очень похожими на спектры действия для биологических реакций на свет [12]. Это предположено. что это поглощение световой энергии может вызывать фотодиссоциацию ингибирующего оксида азота от ССО, что приводит к усилению активности фермента, переносу электронов, митохондриальному дыханию и выработке аденозинтрифосфата (АТФ) [13]. В свою очередь, НИЛИ изменяет окислительно-восстановительное состояние клетки, которое вызывает активацию

многочисленных внутриклеточных сигнальных путей и изменяет сродство факторов транскрипции, связанных с пролиферацией, выживанием, репарацией тканей и регенерацией.

1.2.2 Ультрафиолетовая (УФ) фототерапия

Ультрафиолетовая (УФ) фототерапия обычно используется для лечения рефрактерных кожных заболеваний. Длины волн УФ-света подразделяются на УФС (от 100 до 280 нм), УФВ (от 280 до 315 нм) и УФА (от 315 до 400 нм). Тип фототерапии, используемой для лечения АД, - это узкополосный (NB) ультрафиолетовый свет В (UVB). Флуоресцентные лампы, излучающие NB-волны с длинами волн от 311 до 313 нм (NB-UVB), используются при лечении резистентных кожных заболеваний (вульгарный псориаз, обыкновенное витилиго), а те, которые излучают диапазон длин волн 340-400 нм (UVA1), используются для лечения АД. Безопасность NB-UVB света для лечения кожных заболеваний доказана. PUVA - это комбинированное лечение, которое состоит из псораленов (P) с последующим воздействием на кожу UVA, в то время как при лечении NB-UVB используется только ультрафиолетовый свет и, следовательно, он не связан с системной токсичностью и позволяет проводить лечение с низкими затратами. У пациентов с псориазом и АД облучение UVB вызывает повышенную регуляцию регуляторного T (Treg) -клеточные уровни и показали иммуносупрессивный эффект *in vivo*.

Таким образом, свет NB-UVB эффективен для лечения различных кожных заболеваний, вызывающих сильный иммунный ответ [14].

1.2.3 Влияние ультрафиолетовых лучей на клетки

УФ-излучение делится на три диапазона с разными биологическими свойствами: UVA (320–400 нм), UVB (280–320 нм) и UVC (200–280 нм). Озоновый слой Земли блокирует большую часть УФ-С, но только 5% УФ-В-излучения. Часть UVB-излучения, не блокируемая озоновым слоем, проникает только через поверхностные слои эпидермиса и может достигать верхних сосочковых слоев дермы [15]. Тем не менее, не следует пренебрегать вредным воздействием УФВ. Напротив, УФА-излучение поглощается более глубокими слоями дермы. Есть три основных типа УФ-лазеров. Во-первых, Nd: YAG- лазер с модуляцией добротности, в котором ультрафиолетовое лазерное излучение 353 нм изменено с длины волны 1064 нм (инфракрасного) с помощью специального кристалла. Второй тип – это газовый (экимерный) лазер, обычно используемый при лечении псориаза. Третий тип – лазер на парах металлов [16]. Известно, что УФ-излучение вызывает неблагоприятные эффекты на кожу, такие как повреждение клеток, фотостарение и канцерогенез. Кроме того, поглощение излучения хромофорами кожи или образование реактивных свободных радикалов (активных форм кислорода – АФК) из воды, присутствующей в коже, вызывает преждевременное старение кожи, изменение пигментации и потерю коллагена. УФ-излучение влияет в основном на кератиноциты, которые, в свою очередь, начинают выделять провоспалительные цитокины: ИЛ-1, ИЛ-1 и ИЛ-6. Специфические взаимосвязанные циклы секреции провоспалительных цитокинов вызывают синтез и высвобождение матриксной металлопротеиназы 1 (ММР-1). Из-за своего воспалительного действия UVB с его длительным действием

разрушает внутреннюю микроструктуру кожи, что приводит к ее более быстрому старению. Интересно, что Gruber et al. показали аналогичные кожные эффекты УФ–В излучения на моделях кожи человека, реконструированных *in vitro*, таких как MatTex ИпиДерм. Клетки после облучения увеличивали секрецию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8) и простагландина по сравнению с контрольной группой. Эти результаты были подтверждены Penna et al. Взятые вместе, они подтверждают гипотезу о том, что в некоторых случаях реконструированные кожные ткани могут быть хорошей заменой для проведения эффективных кожных тестов, особенно при сохранении морфологии естественной кожи. Было показано, что воздействие ультрафиолетового света может регулировать аутофагию эпидермальных кератиноцитов посредством избирательного подавления ключевых генов, связанных с аутофагией, включая ULK1, ATG3, ATG5 и ATG7 [17]. В фибробластах облучение УФВ вызывает значительно более высокую продукцию АФК, повреждение ДНК и нарушение митохондрий, что приводит к активации многих путей, ведущих к апоптозу, снижению пролиферации клеток и фиброзу кожи. МИКА-Микалак предположили, что УФ-В свет (308 нм, 250 мДж / см²) во время раннего пострадиационного облучения вызывает временные иммунные и ангиогенные ответы в аналоге пигментированной кожи, полученном из клеточных линий, выделенных от пациентов. Исследование местного клеточного ответа показало умеренную пролиферацию клеток дермы аналога кожи. Kwon et al. показали, что светодиодный свет, излучающий свет UVA и UVB (310 и 340 нм), использовавшийся на мышах NC / Nga с атопическим дерматитом, значительно облегчил связанные с заболеванием поражения (зуд, сухость, эритема и отек). Фототерапия УФ-светодиодами ослабляет

секрецию белков, ответственных за атопический дерматит (БА), таких как IL-1a, IL-1, IL-31, белок ICAM-1 и E-селектин, что снижает инфильтрацию тучных тканей и воспалительные процессы. клетки при ослаблении акантоза и кератоза у исследуемых мышей. UVA, поскольку он не проникает глубоко в слои кожи, может влиять на клетки AD, связанные с патогенезом, тем самым вызывая апоптоз T-клеток и уменьшая количество тучных клеток и клеток Лангерганса. В то время как UVB истощает клетки Лангерганса, он регулирует иммунологическую активность кожи при AD. Исследователи предположили, что УФ-светодиоды с узким спектром могут быть хорошим терапевтическим инструментом при БА [18].

2. НАКОЖНАЯ БОЛЕЗНЬ ВИТИЛИГО

Витилиго – это распространенное хроническое заболевание, которое сильно влияет на качество жизни пациентов. Фототерапия с использованием узкополосного ультрафиолетового излучения В и эксимерного лазера – это два метода лечения, которые все чаще используются для лечения заболевания с различными результатами.

В журнале (Академический дерматол) рассматривали эффективность, побочные эффекты и возможные механизмы действия узкополосного ультрафиолетового лазера В и эксимерного лазера при лечении витилиго. Также представлены доступные данные о последующем наблюдении за пролеченными пациентами и некоторые критерии отбора пациентов с большим шансом удовлетворительно ответить на лечение. Витилиго - это заболевание, характеризующееся разрушением меланоцитов, которое происходит в основном в коже и приводит к появлению четко очерченных белых пятен. Точный патофизиологический механизм, который приводит к разрушению меланоцитов, все еще неясен, но недавние исследования лежат в основе важной роли CD81 Т-лимфоцитов в патогенезе витилиго [18]. Витилиго является распространенным явлением и поражает от 0,1% до 2% населения в целом. Для многих пациентов с витилиго обезображивание, вызванное этим заболеванием, оказывает большое влияние на качество их жизни [19]. В настоящее время у нас есть несколько терапевтических методов, которые мы можем использовать для лечения витилиго. Однако по-прежнему очень сложно сравнивать эффективность различных методов лечения и результаты разных исследований одного и того же лечения, потому что: (1) большинство опубликованных исследований неконтролируемы; и (2) не существует общепринятого

биометрического инструмента для оценки тяжести заболевания и реакции на лечение. В результате у нас нет метаанализов лечения витилиго. Большинство методов лечения до настоящего времени оценивались с использованием номинальных бинарных шкал, в которых процент пролеченных пациентов, достигших определенной степени репигментации (обычно (75%)), представлен и сравнивается с помощью непараметрических статистических методов [20].

Чтобы преодолеть это ограничение, Хамзави представили в 2004 г. количественный клинический инструмент, который позволил бы параметрическую оценку витилиго. Этот инструмент получил название «Индекс площади витилиго».

(ВАСИ). Чтобы рассчитать оценку ВАСИ, тело делится на 5 областей, и для каждой области оценка ВАСИ определяется как произведение площади витилиго в единицах руки и степени депигментации в каждой части руки. ВАСИ еще не использовался в исследованиях, оценивающих реакцию витилиго на лечение. Через три года после введения ВАСИ Европейская рабочая группа по витилиго (ВИТФ) предложила для оценки результатов лечения витилиго систему, которая объединяет анализ степени, стадии и прогрессирования заболевания. ВИТФ упомянул в этом отчете [20], что ВАСИ можно использовать в сочетании с их масштабом в будущих исследованиях. Они также подчеркнули необходимость: (1) глобального индекса стадии и распространения витилиго; (2) эксперименты с автоматизированными устройствами для более точной оценки степени; (3) создание обучающего инструмента для оценки витилиго; и (4) организация международной конференции по классификации, постановке и оценке витилиго. Фотохимиотерапия псораленом в сочетании с ультрафиолетом (УФ) А (РУФА) и местные

кортикостероиды долгое время были основой лечения генерализованного и фокального витилиго, соответственно.

В 1997 году, однако, появилось первое сообщение Вестерхофа и Ньивебур-Кроботовой об использовании узкополосной (NB) фототерапии УФВ для лечения витилиго. Источник света NB-УФВ излучает полихроматический свет, но в его спектре излучения преобладает диапазон длин волн от 311 до 313 нм. NB-УФВ был введен примерно за 10 лет до вышеупомянутого отчета для лечения псориаза после наблюдения, что длины волн около 311 нм вызывают меньшую эритему и в то же время являются наиболее эффективными для полного избавления от псориазных поражений. отчет Вестерхофа и Ньивебор-Кроботовой рекомендации по лечению, которые были опубликованы в 1999 г. и не пересматривались, предлагали NB-УФВ в качестве терапии первого выбора для генерализованного витилиго у взрослых и в качестве альтернативной терапии после кортикостероидов класса III. при витилиго у детей. В последующие годы в нескольких исследованиях оценивалась эффективность одного NB-УФВ или в комбинации с другими агентами в лечении витилиго с различными результатами. В ряде исследований также сравнивалась эффективность NBУФВ с эффективностью РУФА у пациентов с витилиго и сообщалось о сопоставимой или немного лучшей эффективности для NB-УФВ. Только в 2001 году эксимерный ксенонхлоридный лазер с длиной волны 308 нм появился в литературе о лечении витилиго. Эксимерный лазер с длиной волны 308 нм излучает монохроматический свет с длиной волны 308 нм и вызывает фотобиологические эффекты, аналогичные NB-УФВ. Несколько исследований показали реакцию пятен витилиго на эксимерный лазер, и он был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США для лечения как витилиго, так и

псориаза. Эксимерная лазерная химическая завивка это избирательная обработка только поврежденной кожи и отсутствие ненужной обработки здоровой кожи. Таким образом, пациент получает меньше радиации. Кроме того, исключается неприглядный загар всей кожи вокруг перилезии, а загар вокруг зоны поражения обычно ограничивается небольшими участками вокруг поражения, которые получили лазерный импульс во время лечения. С другой стороны, такая избирательность делает лечение обширного витилиго очень трудоемким и не может предотвратить появление новых поражений на необработанных участках тела. Наконец, еще одним недостатком лазерного лечения по сравнению с NB-УФВ является его высокая стоимость. NB-УФВ и эксимерный лазер с длиной волны 308 нм – это два варианта лечения витилиго, сочетающие в себе высокую эффективность и минимальные побочные эффекты, и в ближайшие годы они будут все шире использоваться для лечения этого заболевания. В этом обзоре мы представим имеющиеся данные об их эффективности, побочных эффектах и механизме действия.

2.1 Ближний диапазон УФВ эффективность

Не существует общепринятого протокола для NBУФВ, поэтому протоколы лечения различаются от исследования к исследованию. Сеансы проводятся дважды или трижды в неделю в непоследовательные дни. Начальная доза составляет от 100 до 280 мДж / см². В большинстве исследований доза впоследствии увеличивается на 10–20% за сеанс. Во многих исследованиях доза стабилизируется при развитии легкой эритемы. Как правило, после первых нескольких сеансов скорость увеличения дозы УФВ индивидуализируется для каждого пациента. Репигментация более

75% (которая считается косметически приемлемой репигментацией) была достигнута у 12,5% от до 75% пролеченных пациентов примерно через 1 год лечения. Лучшие результаты были получены в двух исследованиях, проведенных в том же центре в Индии: 71,4% и 75% пациентов достигли косметически приемлемой репигментации. Два исследования из того же центра в Нидерландах также сообщили о высокой частоте (53% 9 и 63% 6) косметически приемлемой репигментации. Самый низкий уровень ответа был зарегистрирован у пациентов из Азии: 33% и 12,5% в исследованиях из Таиланда и Тайваня соответственно [21].

Вышеупомянутая вариабельность ответа на лечение может быть объяснена несколькими факторами. Один из них - фототип кожи участников исследования. Все пациенты в исследованиях из Индии имели фототип кожи IV или V, а два голландских исследования включали высокий процент пациентов с фототипами кожи от III до V. В серии 18 [21] 64,2% пациентов имели фототипы кожи с III по V и а. Многофакторный анализ показал статистически значимое отношение шансов 6,68 для этих пациентов для достижения косметически приемлемой репигментации на лице по сравнению с пациентами с фототипами кожи от I до II. Однако эта тенденция не наблюдалась на нефациальной коже. В других исследованиях [22] и [23] не сообщалось об отсутствии корреляции между ответом на лечение и фототипом кожи, но в некоторые были включены пациенты с фототипами кожи с III по V (без более светлых), тогда как в другом анализировалась реакция на лечение нефациальной кожи, где мы тоже не нашли ассоциации. Основываясь на этих данных, мы полагаем, что пациенты с фототипами кожи от III до V имеют больше шансов достичь косметически приемлемой репигментации на лице по сравнению с пациентами с фототипами кожи от I до II. Еще один

фактор, который может повлиять на реакцию на лечение, - это расположение поражений. В нескольких исследованиях сообщается о лучших показателях ответа (без статистического подтверждения) при поражениях лица по сравнению с поражениями на остальной части тела. В серии 18 и в исследовании Анбара и др. была задокументирована статистически значимая разница.

Поражения акральных участков (кистей и стоп) всегда демонстрируют минимальный ответ, и в одном исследовании [24] это наблюдение было статистически подтверждено. Причина этой анатомической вариабельности в ответ на лечение неясна, но она может быть связана с региональными вариациями плотности волосяных фолликулов, которые, как было показано, являются резервуарами меланоцитов. По всей видимости, нет связи между ответом на лечение и пол пациентов, возраста, положительный семейный анамнез витилиго, и пораженная площадь поверхности тела. Связь между ответом на лечение и продолжительностью витилиго неясна: Некоторые исследования сообщают о такой связи [22] и [24], тогда как другие – нет [16] и [21]. Более ранний ответ на лечение коррелировал с более высоким уровнем репигментации после лечения. Chen et al показали, что более короткий период до начальной репигментации коррелирует с более высоким процентом окончательной репигментации. В серии [21] 18 пациентов, которые отреагировали уже через 1 месяц лечения, достигли более высокого уровня репигментации по сравнению с теми, кто ответил позже. Если это открытие подтвердится, можно будет идентифицировать пациентов с большей вероятностью достижения удовлетворительной окончательной репигментации на раннем этапе лечения. У некоторых пациентов с фототипами кожи IV и V, вновь репигментированная кожа может быть темнее естественного цвета кожи пациента. Эта

гиперпигментация проходит через пару месяцев, обеспечивая хороший косметический результат. Данные наблюдения за пациентами после прекращения приема NB-УФВ ограничены. В серии из 18 случаев наблюдали 25 пациентов в течение 4 лет после прекращения фототерапии. Рецидив наблюдался у 44% из них в течение 1 года после прекращения лечения. У 14,3% пациентов через 4 года после лечения новые очаги витилиго в репигментированных областях не появлялись. Sitek et al наблюдали за 11 пациентами с общей репигментацией более 75% после курса NB-УФВ и сообщили, что 45% пациентов достигли полной ремиссии через 2 года после окончания лечения. Natta et al наблюдали за 9 пациентами в течение 2 лет и сообщили о 25% и 43% частоте рецидивов через 1 год и 18 месяцев, соответственно, тогда как в серии, проведенной Kanwar et al., 14 из 8 пациентов, которых они наблюдали, рецидивы произошли в течение 1 года. 3 месяца. Пациенты, у которых наблюдается рецидив, обычно поддаются повторному курсу лечения. Побочные эффекты Острые побочные эффекты при приеме NB-УФВ случаются нечасто; включают только эритему, кожный зуд и ксероз; и обычно проходят после местного применения смягчающих средств. Хронические побочные эффекты NB-УФВ включают фотостарение и фотоканцерогенез. Было показано, что NB-УФВ вызывает повреждение ДНК в культурах клеток, и в моделях кожи человека и животных, механизм, который приводит к канцерогенезу. Однако недавнее исследование [25] не предоставило доказательств повышенного риска рака кожи у пациентов с псориазом, получавших лечение широкополосным или NB-УФВ.

В другом исследовании не было обнаружено повышенного риска меланомы или плоскоклеточного рака у пациентов, получающих NB-УФВ для заболеваний, отличных от витилиго, но

повышенный риск был очевиден для базальноклеточного рака. Пока нет данных о канцерогенезе у пациентов с витилиго, получавших NB-УФВ, но поскольку развитие рака кожи у пациентов с витилиго кажется редким, разумно ожидать, что пациенты с витилиго не будут иметь повышенного риска. по сравнению с другими пациентами, получающими NB-УФВ. Пока не будет больше данных, NB-УФВ считается менее канцерогенным, чем PUVA, 59 но все же его следует использовать с осторожностью, а пациенты, получающие долгосрочную терапию, должны регулярно наблюдаться [25].

2.1.1 Механизм действия NB-UVB на пациентов с витилиго

Механизм действия NB-УФВ на пациентов с витилиго полностью не выяснен. У пациентов с витилиго активные меланоциты в эпидермисе разрушаются, в то время как неактивные (допанегативные) меланоциты во внешних корневых оболочках волосяных фолликулов не затрагиваются. Предполагается, что репигментация инициируется активацией, пролиферацией и миграцией этих меланоцитов. вверх по поверхности наружного влагалища корня к ближайшему эпидермису, где они образуют перифолликулярные пигментные острова. Недавно было продемонстрировано, что NB-УФВ может стимулировать значительное увеличение высвобождения основного фактора роста фибробластов и эндотелина-1 из кератиноцитов. , оба из которых индуцировали пролиферацию меланоцитов. Кроме того, миграция меланоцитов может быть усилена NB-УФВ за счет стимуляции экспрессии фосфорилированной киназы фокальной адгезии

(p125FAK) на меланоцитах и за счет повышенной экспрессии активности матричной металлопротеиназы-2 меланоцитами [26].

Иммунодепрессивное действие NB-УФВ также может вносить свой вклад к лечению витилиго. Как упоминалось выше, Т-лимфоциты, по-видимому, участвуют в патогенезе заболевания¹, и поэтому индукция апоптоза Т-лимфоцитов с помощью NB-УФВ70 может играть ключевую роль в репигментации поражений витилиго [27].

2.1.2 Эксимерный лазер 308 нм

Эффективность После первого сообщения о случае, сделанного Бальтас [28] несколько в исследованиях оценивалась эффективность 308-нм эксимерного лазера при витилиго. Сеансы проводят 2–3 раза в неделю в течение периода от 4 до 36 недель. Репигментация происходит быстрее при лечении трижды в неделю, но конечная скорость репигментации, по-видимому, зависит от общего количества сеансов, а не от их частоты [29].

Более 75% обычно сообщается от 15% до 50% пролеченных поражений. Расположение поражений, по-видимому, является лучшим предиктором ответа: поражения на лице, [30] [32] [34] [36] [38] шее, [32] [34] 35 38 [39] [33] и туловище реагируют в большей степени чем поражения на конечностях. Поражения на руках и ногах, как правило, имеют наименее благоприятный прогноз. Однако только в исследованиях Астовари [35] и Хофер [39] был проведен статистический анализ для подтверждения вышеуказанных наблюдений. В этих исследованиях статистически значимо лучший ответ наблюдался в областях, чувствительных к ультрафиолету (лицо, шея, спина, грудь и руки), по сравнению с областями, устойчивыми к

ультрафиолету (колени, локти, запястья, кисти, лодыжки и ступни). Кроме того, в исследовании [35], хотя все УФ-чувствительные области реагировали более или менее одинаково, среди УФ-устойчивых областей, колени, локти и запястья реагировали значительно лучше, чем руки, лодыжки и ступни. В двух исследованиях [31] [37] сообщалось о лучшем исходе у пациентов с более темной кожей (тип III-VI по сравнению с I-II), но статистический анализ для подтверждения этого наблюдения не проводился.

2.1.3 Побочные эффекты

Сеансы обычно хорошо переносятся, а побочные эффекты минимальны. Обычно сообщается о легкой или сильной эритеме, тогда как волдыри и зуд наблюдаются изредка.

2.1.4 Комбинированная терапия

В соответствии с NB-УФВ, местный такролимус [37] и кальципотриол [31] также были оценены на предмет возможного синергетического эффекта с эксимерным лазером при лечении витилиго. Такролимус для местного применения. В двух проспективных рандомизированных внутрииндивидуальных исследованиях [34] [37] оценивалось возможное синергетическое действие эксимерного лазера с длиной волны 308 нм и такролимуса. В первом исследовании [34] сравнивалась эффективность эксимерного лазера с длиной волны 308 нм в сочетании с местным нанесением 0,1% мази такролимуса дважды в день с монотерапией эксимерным лазером. Было проведено два сеанса в неделю, всего 24 сеанса. В чувствительных к УФ-излучению областях уровень репигментации 75% или более был достигнут в 77% поражений, леченных комбинированной терапией, по сравнению с 57% поражений, обработанных лазерной монотерапией. Однако в областях, устойчивых к ультрафиолетовому излучению, указанные выше процентные значения составили 60% и 0% соответственно ($P < .002$). Таким образом, комбинированная терапия явно превосходила лазерную монотерапию в областях, устойчивых к УФ-излучению. Сопоставимые результаты были также представлены Кавалек [37] В своем исследовании они выполняли 3 сеанса в неделю и использовали крем-плацебо. 50% пластырей, получавших комбинированную терапию такролимусом, достигли 75% репигментации по сравнению с 20% пластырей, обработанных лазером и кремом-плацебо. Краткосрочные побочные эффекты, как правило, не влияли на добавление такролимуса, за исключением почесывания⁴⁰ и

умеренной гиперпигментации очагов и перилезий, которая исчезла в течение 3 недель.

2.1.4.1 Механизм действия

Механизм действия эксимерного лазера при витилиго неизвестен. Можно было бы предположить аналогичный механизм действия с NB-УФВ. Однако есть несколько различий между NB-УФВ и эксимерным лазером, которые необходимо учитывать. Источники NBUVB излучают полихроматический, непрерывный, некогерентный свет, тогда как эксимерный лазер излучает монохроматический и когерентный луч света короткими импульсами с гораздо большей интенсивностью. Уже было обнаружено, что эксимерный лазер является более мощным индуктором апоптоза T-клеток, чем NB-УФВ [40]. Нельзя исключать и другие различия в механизме действия между NB-УФВ и эксимерным лазером.

NB-УФВ и эксимерный лазер могут вызывать репигментацию у многих пациентов с витилиго, но частота и продолжительность индуцированной репигментации различны. Некоторые пациенты, например, с кожей, которая легко загорает, и определенные области, такие как лицо, кажутся более благоприятными. Пациенты должны быть проинформированы о вариабельности ожидаемых результатов и должны участвовать в принятии решения о том, начинать лечение или нет. Согласно нашему опыту в больницах, пациенты редко разочаровываются из-за ограничений лечения. Большинство из них готовы начать лечение, которое может дать им шанс на улучшение, и они ценят индуцированную репигментацию, даже если она не самая лучшая из возможных.

3. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

3.1 Создание макетов лазеров УФ диапазона на активных средах $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}^{3+}\text{Yb}$

Для изучения влияния на клетки излучения ультрафиолетового диапазона спектра был собран лазер на активной среде $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}^{3+}+\text{Yb}^{3+}$. На рисунке 1 представлена схема лазерной установки.

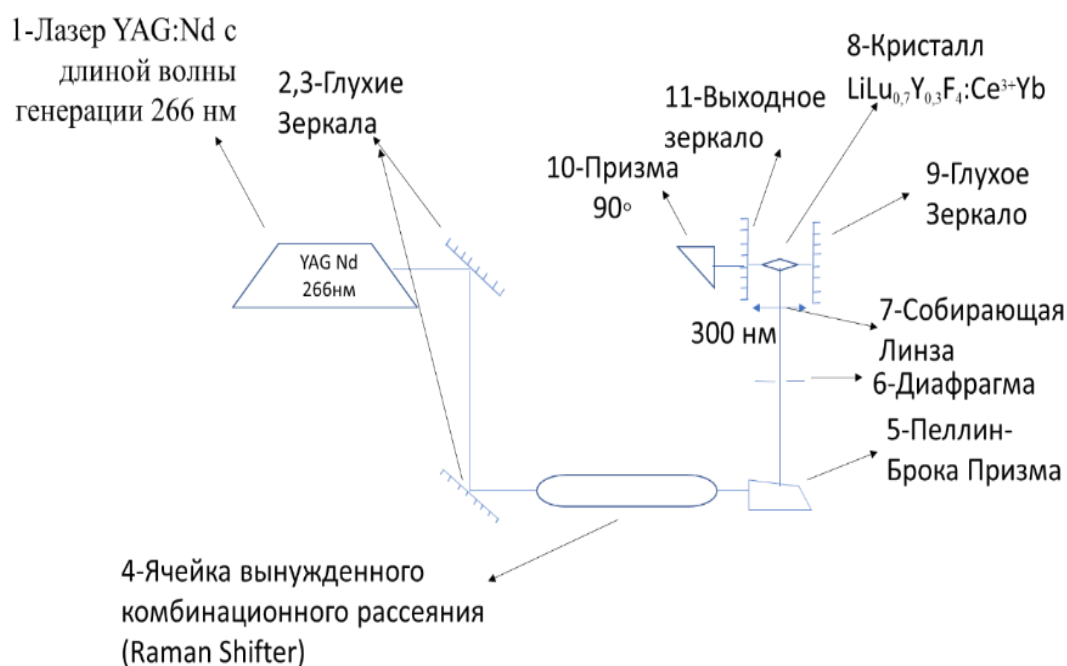


Рисунок 1 – Схема экспериментальной установки. 1 – лазер $\text{YAG}:\text{Nd}^{3+}$; 2,3 – «глухие» зеркала с коэффициентом отражения $R = 99,9\%$; 4 – ВКР ячейка, 5- призма Пеллин-Брока; 6- диафрагма; 7- собирающая линза ; 8 - кристалл $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}^{3+}\text{Yb}$; 9-«выходное» зеркало с коэффициентом отражения $R = 25\%$; 10-призма 90°; 11- «заднее» зеркало с коэффициентом отражения $R = 50\%$

Накачка лазера организована следующим образом. $YAG:Nd^{3+}$ - это твердотельный лазер (легированный неодимом иттрий-алюминиевый гранат; Nd: $Y_3Al_5O_{12}$) представляет собой кристалл, который используется в качестве среды для генерации твердотельных лазеров. Добавка, трехкратно ионизированный неодим, Nd (III), обычно замещает небольшую часть (1%) ионов иттрия в основной кристаллической структуре иттрий-алюминиевого граната (YAG), поскольку два иона имеют одинаковый размер. ион неодима, обеспечивающий лазерную активность в кристалле. $YAG:Nd^{3+}$ включает в себя генераторы второй и четвертой гармоник, генерирует лазерное излучение с длинами волн 266 нм и 532 нм. В нашей экспериментальной установке излучение с длиной волны 266 нм попадает в ВКР ячейку (4), заполненную газообразным H_2 , и преобразовано в излучение с длиной волны 300 нм.

Резонатор лазера на кристалле $LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4:Ce^3Yb$ собран следующим образом. С помощью собирающей линзы (7) излучение с длиной волны 300 нм фокусировалось в линию, это в свою очередь увеличивает плотностью энергии. Зеркало (9) и зеркало (11) образуют плоскопараллельный резонатор с кристаллом (8), характерный размер резонатора сводится к минимальному и составляет 2,5 см. Длина резонатора укорачивается с целью уменьшения времени жизни фотона в резонаторе, что приводит к уменьшению длительности импульса.

Понятие коротких и ультракоротких импульсов применяется к импульсам длительностью в сотни пикосекунд. Впервые лазер смог преодолеть этот порог с помощью переключателя добротности на насыщающемся поглотителе. Можно выделить два принципиально разных метода получения коротких импульсов: метод модуляции добротности и синхронизацию мод, которая может быть активной

или пассивной в зависимости от наличия внешнего модулятора или синхронизатора [41].

Принцип работы метода модуляции добротности заключается в использовании затвора внутри резонатора. Поскольку в закрытом состоянии заслонка предотвращает отражение фотонов от отражающего зеркала, что увеличивает усиление, тем самым минимизируя добротность резонатора. При открытии заслонки накопленный рефлекс резко затухает в виде короткого интенсивного импульса.

Механические устройства (например, вращающиеся призмы), акустооптические устройства (например, пьезоэлектрические элементы) или фотоэлектрические устройства (ячейка Поккельса) могут использоваться в качестве вентилях, все из которых являются активными Q-переключателями. С их помощью достигаются интервалы импульсов в наносекунды. Насыщаемые поглотители обычно используются для отрицательного переключения добротности, поскольку они представляют собой особый элемент внутри резонатора, который также поглощает все резонансное излучение и действует как закрытая заслонка. В насыщенном состоянии эта среда становится прозрачной и, таким образом, действует как открытая заслонка. Из-за быстрых процессов релаксации этого метода время, в течение которого затвор остается в открытом положении, может составлять порядка десятков пикосекунд.

Метод синхронизации мод представляет собой соединение фаз различных структур кавитации, участвующих в процессе генерации. Благодаря добавлению фазовых диаграмм можно получить одиночный импульс длительностью несколько фемтосекунд.

Режим синхронизации также делится на активный и пассивный. Активная модуляция включает в себя амплитудную модуляцию, которая означает синхронизацию мод с использованием амплитудного модулятора, частотную модуляцию, которая означает синхронизацию мод с использованием фазового модулятора, и синхронную синхронизацию мод накачки, которая представляет собой синхронизацию мод путем модуляции усиления лазера. В настоящее время широко используются методы пассивной синхронизации мод из-за их простоты и высокой эффективности. Самым распространенным методом остается фиксация на основе линз CARE и насыщающихся поглотителей. Первый метод использует свойство самофокусировки луча в результате эффекта Керра [42] (изменение показателя преломления материала пропорционально квадрату приложенного электрического поля); Следовательно, пик интенсивного импульса и неэкстремальные границы временного распределения разделены в вакууме. Таким образом, с каждым обходом резонатора длительность импульса может быть сокращена. В этом случае минимальная длительность импульса будет определяться шириной полосы усиления активной среды. Примером режима блокировки на насыщающемся поглотителе является технология SESAM (полупроводниковые абсорбционные зеркала) [43]. Известно, что характерные времена релаксации полупроводников в зоне проводимости составляют десятки и сотни фемтосекунд. Использование отражающего зеркала с напылением полупроводника позволяет получать фемтосекундные импульсы при насыщении полупроводника.

После обобщения литературных данных исследуемая активная среда $\text{LiLu}_{0.7}\text{Y}_{0.3}\text{F}_4:\text{Ce}^{3+}$ представляется перспективной для получения перестраиваемого лазерного излучения с короткими импульсами в

ультрафиолетовой области спектра. Укорочение импульса может быть достигнуто путем модуляции добротности резонатора из-за разброса центров окраски. Изменение внешних факторов может изменить потерю центров окраски, что, следовательно, изменит глубину модуляции добротности и параметры мощности.

Уровни энергии $\text{LiLuF}_4: \text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYF}_4: \text{Ce}^{3+}$ являются активными средами, позволяя образовывать центры окраски.

Как показано в [44] [45] [46], в исследуемых активных средах образуются центры окраски, участвующие в формировании лазера.

Помимо индуцированной системы центров окраски в исследуемых активных средах существует также поглощение из возбужденного состояния. Это поглощение участвует в формировании лазера и должно учитываться при моделировании активной среды. На рисунке 2 представлена энергетическая диаграмма уровней активной среды.

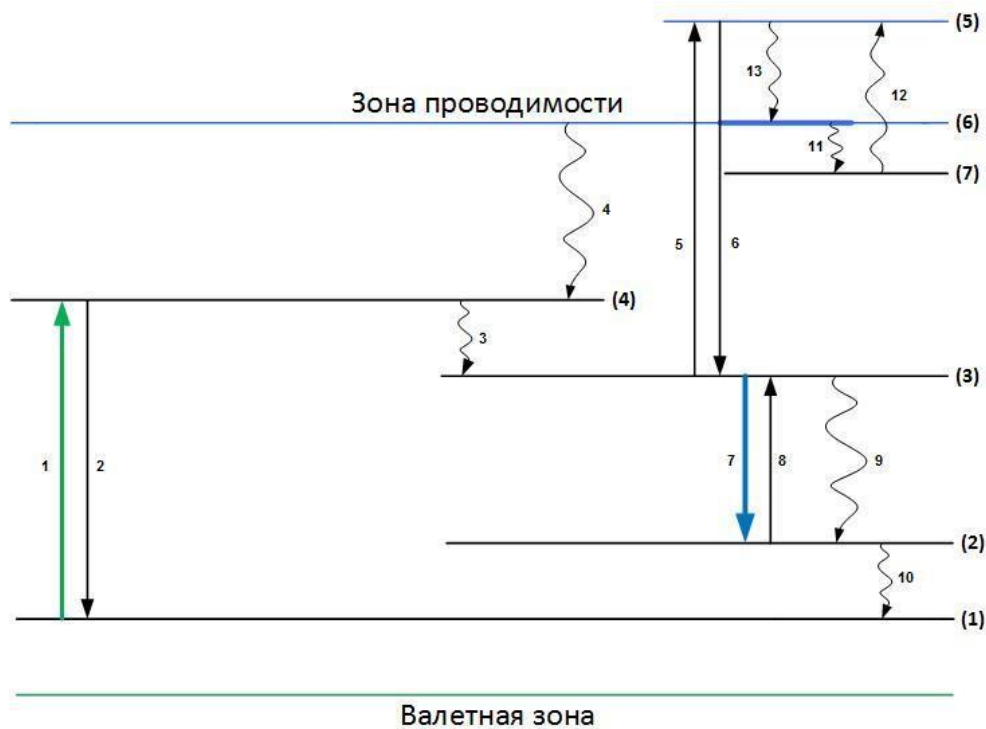


Рисунок 2 – Схема энергетических уровней в кристаллах $\text{LiLuF}_4: \text{Ce}^{3+}$ и $\text{LiYF}_4: \text{Ce}^{3+}$

Фторидные активные среды, активированные ионами Ce^{3+} , работают по хорошо четырехуровневой схеме. Основной уровень иона-активатора обозначен 1. Резонансная 4f-5d переходу накачка соответствует переходу электрона с 1-ом на 4 энергетический уровень. Быстрой безызлучательной релаксации электрон переходит на уровень 3. Уровень 3 является верхним лазерным уровнем. Лазерная генерация возникает между уровнями 3 и 2 после, чего электрон путем безызлучательной релаксации возвращается на основной уровень. Уровень 5 – это уровень в зоне проводимости, на который происходит заселение за счет поглощения из вынужденного состояния. Далее электрон термализуется на дно зоны проводимости-уровень 6. На конец уровень 7 образуется за счет наведенных центров окраски и в общем случае может представлять собой систему уровней.

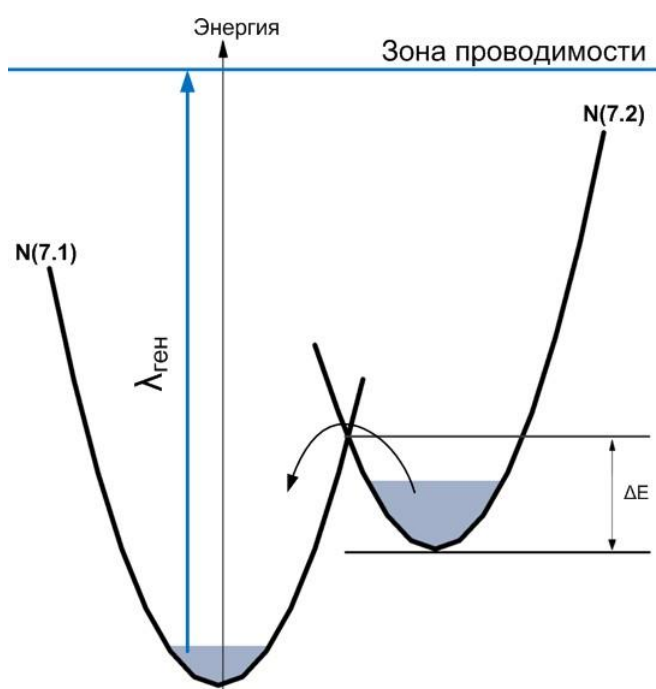


Рисунок 3 – Схема энергетических уровней наведенной системы центров окраски в активной среде $\text{LiLu}_{0.7}\text{Y}_{0.3}\text{F}_4:\text{Ce}^{3+}$

Переходы 1 и 2 образуются за счет поглощения излучения накачки и вынужденного излучения под действием излучения накачки. Переходы 3,10 – эти быстрые безызлучательные переходы, которые связанные с релаксацией, переход 9 – это спонтанное излучение. Переходы 5 и 6 образованы в силу поглощения из возбужденного состояния и вынужденного излучения. Переход 7 – это вынужденное излучение, называется лазерная генерация. 8 - это поглощение лазерной генерации. Переход 4 – является рекомбинация с центра окраски на центр церия, 11 – это захват электрона с зоны проводимости центром окраски. 12–термическое высвобождение электрона, 13– термализация электронов в зоне проводимости.

В силу чувствительности центров окраски к температуре нами была предложена модель уровней системы центров окраски, которая включает в себя, как минимум, два энергетических уровня представленных на рисунке (уровни N(7.1) и N(7.2)). В общем случае она представляет собой два энергетических уровня представленных на конфигурационно координатной диаграмме. При вышении температуры, согласно распределению (Больцмана), вероятность заселения уровня, соответствующего пересечению энергетических уровней растёт (обозначим этот уровень E_1). Таким образом, вышение температуры означает увеличения населенности уровня N(7.1), который в свою очередь взаимодействует с генерируемом лазерным излучением. Важными параметрами в описании данного процесса это температура активной среды и энергетический зазор между дном уровня N(7.2) и уровнем E_1 . Их отношение, в первую очередь, определяет эффективность передачи населенности с одного уровня на другой.

3.2 Методика измерений

Методы, использованные для достижения целей данной работы: МТТ-тест, проточная цитометрия и метод культивирования фибробластов.

Оценку выживаемости клеток осуществляли после облучения с использованием МТТ [47] (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США). Метод МТТ, впервые описан Мосмань [48]. 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 заседали 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. После облучения в лунки вносили по 5 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали в течение 3 ч. при 37⁰ С в атмосфере 5% CO₂. 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.

Кроме того, для более детального изучения влияния облучения был использован метод проточной цитометрии. В рамках этих экспериментов к клеткам также присаживали специфические красители DiOC6+PI [49].

3.3 Культивирование клеток фибробластов

Биологическую активность действия когерентного ультрафиолетового излучения характеризовали при помощи культуры фибробластов кожи от человека (HSF). Культура фибробластов из биопсии здорового донора была предоставлена НОЦ фармации Университета короля Фейсала. 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.

Клетки в лаборатории были извлечены из культуральных колб согласно Freshney (Freshney, 2015):

- 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. Осадок клеток ресуспендировали в небольшом объеме полной среды культивирования;
- 6) Подсчитывали клетки в камере Горяева.

Для характеристики биологической активности действия когерентного УФ излучения культуру клеток HSF снимали с поверхности культуральных сосудов при помощи трипсинизации (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.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изменения длительности импульса мы изменяли время жизни фотона в резонаторе за счет изменения коэффициента отражения зеркал в резонаторе. В итоге мы использовали два варианта с длительностями 10 нс и 1 нс, как это представлено на рисунках 4А и 4Б соответственно. Чтобы изменять длину волны излучения мы включили в резонатор диспергирующую призму. На рисунке 4В представлена характеристика перестройки длины волны.

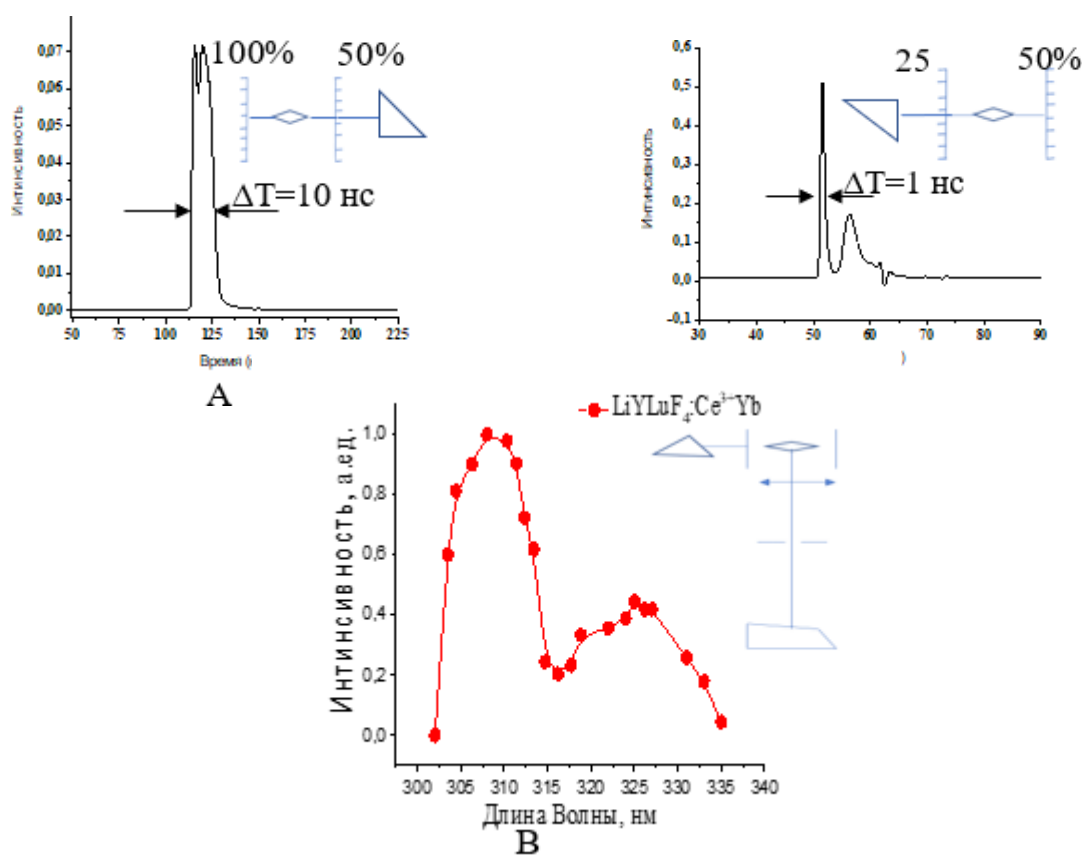
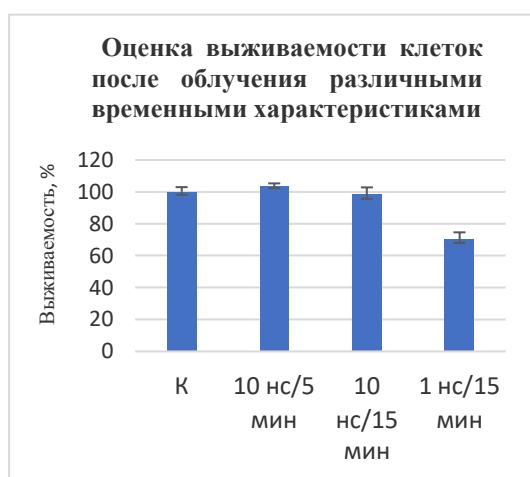
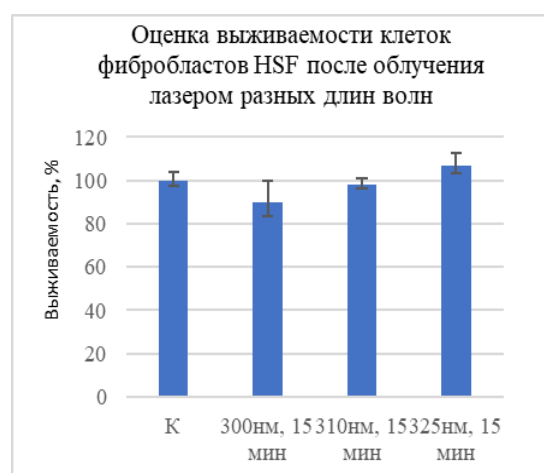


Рисунок 4 А – Форма импульса с длиной волны $\lambda = 310$ нм и длительностью $t = 10$ нс Б – Форма импульса с длиной волны $\lambda = 310$ нм и длительностью $t = 1$ нс В – Перестройка длины волны

Полученные результаты оценки выживаемости клеток HSF в после облучения УФ лазерным светом с длиной волны 310 нм с различными режимами (длительность импульса 1 нс, экспозиция 15 мин, длительность импульса 10 нс, экспозиция 15 мин, длительность импульса 10 нс, экспозиция 5 мин) представлены на рисунке 5А. По данным, представленным на графике, видно, что при укорочении длительности импульса выживаемость уменьшается. Также проводили эксперименты с изменением длины волны света облучения (300 нм, 310 нм, 325 нм), полученные результаты представлены на рисунке 5Б.



А



Б

Рисунок 5 – Влияние режима обработки лазерным излучением УФ диапазона спектра на жизнеспособность клеток первичной культуры кератиноцитов человека. Контроль – кератиноциты в тестовом планшете без облучения, А – Оценка выживаемости для различных вариантов длительности импульса и экспозиции, Б – Оценка влияния ультрафиолетового когерентного излучения лазера на активной среде $\text{LiYLuF}_4:\text{Ce}^{3+}$ с длинами волн 300 нм, 310 нм, 325 нм

Цитометрия показала, что 80% клеток были с разрушенной цитоплазматической мембраной (ЦПМ), при этом 87% содержали целые митохондрии. Нарушение в ЦПМ может быть связано либо с окислением липидной оболочки за счет активного образования АФК, либо за счет прямого разрушения мембраны. Полученные результаты оформлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты проточной цитометрии

№ события	Количество событий	Комментарии
I	0.4%	DiOC6+PI- (живые)
II	12.6%	DiOC6-PI- (с поврежденными митохондриями)
III	6.2%	DiOC6-PI+ (мертвые, поздний апоптоз)
IV	80.8%	DiOC6+PI+ (дырявая цитоплазматическая мембрана)

ВЫВОДЫ

В данной работе Реализована лазерная генерация на активной среде $\text{LiLu}_{0,7}\text{Y}_{0,3}\text{F}_4:\text{Ce}+\text{Yb}$ в импульсном режиме с перестройкой длины волны от 305 до 335 нм, а также с различными длительностями импульсов. Культивированы клетки фибробластов. Оценена жизнеспособность клеток кожи человека под действием лазерного УФ излучения. Показано, что выживаемость клеток фибробластов оказывается меньше при облучении УФ светом с более короткой длительностью импульса (1 нс). Также показано, что выживаемость уменьшается при укорочении длины волны УФ лазерного света. Методом проточной цитометрии установлено, что в результате УФ лазерного облучения фибробластов в 80 % случаев оказывается поврежденной цитоплазматическая мембрана, то есть наше облучение каким-то образом воздействует на целостность мембраны клетки.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Исследование влияния длительности лазерных импульсов ультрафиолетового диапазона спектра на клетки / Яра Хамдан, Э. И. Мадиров, Н. И. Шамсутдинов, А. А. Шавельев, М. А. Марисов, П. В. Зеленихин, В. В. Семашко, А. С. Низамутдинов. – Текст : непосредственный // Материалы 65-ой междунар. науч. конф., Астрахань, (26-30 апреля 2021 г.). – [В печати].
2. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЛАЗЕРНЫХ ИМПУЛЬСОВ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ДИАПАЗОНА СПЕКТРА НА КЛЕТКИ ФИБРОБЛАСТОВ / Яра Хамдан, Э. И. Мадиров, Н. И. Шамсутдинов, А. А. Шавельев, М. А. Марисов, П. В. Зеленихин, В. В. Семашко, А. С. Низамутдинов. – Текст : непосредственный // Естественные и технические науки структурные преобразования и перспективные направления развития в XXI веке : материалы междунар. науч. конф., (28 мая 2021 г.). – С. 385-392.
3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЛАЗЕРНЫХ ИМПУЛЬСОВ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ДИАПАЗОНА СПЕКТРА НА КЛЕТКИ клетки / Яра Хамдан, Э. И. Мадиров, Н. И. Шамсутдинов, А. А. Шавельев, М. А. Марисов, П. В. Зеленихин, В. В. Семашко, А. С. Низамутдинов. – Текст : непосредственный // Сборник тезисов. Итоговая научная конференция студентов Институт Физики : – КФУ, Казань, 2021. – [В печати].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Генина, Э. А. Методы биофотоники: фототерапия: учебно-методическое пособие / Э.А. Генина. – Саратов : Новый ветер, 2012. – 119 с. – Текст : непосредственный.
- 2) Baron, E. D. Introduction to photobiology / E.D. Baron, A.K. Suggs. – Текст : непосредственный // *Dermatologic clinics*. – 2014. – V. 32. – P. 255-266.
- 3) Ultra-short pulses UV lasing in multifunctional Ce: LiY 0.3 Lu 0.7 F 4 active medium / I.I. Farukhshin, A.S. Nizamutdinov, S.L. Korableva, V. v Semashko. – Текст : непосредственный // *Optical Materials Express*. – 2016. – V. 6. – P. 1131-1137.
- 4) Markolf, H.N. Laser-tissue Interactions Fundamentals and Applications / H.N. Markolf ; Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, 2007. – 308 p. – Текст : непосредственный.
- 5) Paras, N.P. Introduction to Biophotonics / N.P. Paras ; Newjersy: J. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2003. – 618 p. – Текст : непосредственный.
- 6) Dederich, D. N. Laser/tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissue? / D.N. Dederich. – Текст : непосредственный // *Journal of the American Dental Association* (1939). – 1993. – V. 124. – P. 57-61.
- 7) Intraocular Nd: YAG laser surgery: laser-tissue interaction, damage range, and reduction of collateral effects / A. Vogel, P. Schweiger, A. Frieser [et al.]. – Текст : непосредственный // *IEEE Journal of Quantum Electronics*. – 1990. – V. 26. – P. 2240-2260.

- 8) Jelínková, H. Introduction: the history of lasers in medicine / H. Jelínková. – Текст : непосредственный // Lasers for medical applications. – 2013. – P. 1-13.
- 9) Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring / P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam [et al.]. // Seminars in cutaneous medicine and surgery. NIH Public Access, – 2013. – 41 p. – Текст : непосредственный.
- 10) The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy / H. Chung, T. Dai, S.K. Sharma [et al.]. // Annals of biomedical engineering. – 2012. – V. 40. – P. 516–533. – Текст : непосредственный.
- 11) Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration / A. Gupta, P. Avci, M. Sadasivam, [et al.]. – Текст : непосредственный // Biotechnology advances. – 2013. – V. 31. – P. 607–631.
- 12) Karu, T. I. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy / T.I. Karu, S.F. Kolyakov – Текст : непосредственный // Photomedicine and Laser Therapy. – 2005. – V. 23. – P. 355-361.
- 13) Increase in H^+/e^- -ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser / D. Pastore, M. Greco, V.A. Petragallo, S. Passarella. – Текст : непосредственный // Biochemistry and molecular biology international. – 1994. – V. 34. – P. 817-826.
- 14) Irradiation with 310 nm and 340 nm ultraviolet light-emitting-diodes can improve atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice / T.-R. Kwon, J.H. Kim, J.-Y. Hong [et al.]. – Текст : непосредственный // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2018. – V. 17. – P. 1127-1135.
- 15) Effect of Different Wavelengths of Laser Irradiation on the Skin Cells / A. Cios, M. Cieplak, Ł. Szymański [et al.]. – Текст :

- непосредственный // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – P. 2437.
- 16) Zoghi, M. Acoustic effects of metal vapor lasers / M. Zoghi, P. Parvin, S. Behrouzinia [et al.]. – Текст : непосредственный // Applied optics. – 2009. – V. 48. – P. 3460-3467.
- 17) Ultraviolet B radiation down-regulates ULK1 and ATG7 expression and impairs the autophagy response in human keratinocytes / X. Chen, L. Li, S. Xu [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2018. – V.178. – P. 152-164.
- 18) Topical tacrolimus and the 308-nm excimer laser: a synergistic combination for the treatment of vitiligo / T. Passeron, N. Ostovari, W. Zakaria [et al.]. – Текст : непосредственный // Archives of dermatology. – 2004. – V.140. – P. 1065–1069.
- 19) Psychosocial effects of vitiligo / K. Ongenaes, L. Beelaert, N. van Geel, J. Naeyaert. – Текст : непосредственный // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2006. – V. 20. – P. 1-8.
- 20) Taïeb, A. The definition and assessment of vitiligo: a consensus report of the Vitiligo European Task Force / A. Taïeb, M. Picardo. – Текст : непосредственный // Pigment Cell Research. – 2007. – V. 20. – P. 27-35.
- 21) Narrowband ultraviolet B phototherapy and 308-nm excimer laser in the treatment of vitiligo: a review / E. Nicolaidou, C. Antoniou, A. Stratigos, A.D. Katsambas. – Текст : непосредственный // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2009. – V. 60. – P. 470-477.
- 22) Narrow-band UVB for the treatment of vitiligo: an emerging effective and well-tolerated therapy / A.J. Kanwar, S. Dogra, D.

- Parsad, B. Kumar. – Текст : непосредственный // International journal of dermatology. – 2005. – V. 44. – P. 57-60.
- 23) Westerhof, W. Treatment of vitiligo with UV-B radiation vs topical psoralen plus UV-A / W. Westerhof, L. Nieuweboer-Krobotova. – Текст : непосредственный // Archives of dermatology. – 1997. – V. 133. – P. 1525-1528.
- 24) Evaluation of the effects of NB-UVB in both segmental and non-segmental vitiligo affecting different body sites / T.S. Anbar, W. Westerhof, A.T. Abdel-Rahman, M.A. El-Khayyat. – Текст : непосредственный // Photodermatology, photoimmunology & photomedicine. – 2006. – V. 22. – P. 157-163.
- 25) Seo, S.-L. Squamous cell carcinoma in a patient with generalized vitiligo / S.-L. Seo, I.-H. Kim. – Текст : непосредственный // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2001. – V.45. – P. 227-229.
- 26) Cui, J. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo / J. Cui, L.-Y. Shen, G. Wang– Текст : непосредственный // Journal of investigative dermatology. – 1991. – V.97. – P. 410-416.
- 27) Wu, C. Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes / C. Wu, C. Yu, C. Wu [et al.]. – Текст : непосредственный // Experimental dermatology. – 2004. – V.13. – P. 755-763.
- 28) Repigmentation of localized vitiligo with the xenon chloride laser / E. Baltas, P. Nagy, B. Bonis [et al.]. – Текст : непосредственный // British Journal of Dermatology. – 2001. – V.144. – P.1266-1267.
- 29) Spencer, J. M. Treatment of vitiligo with the 308-nm excimer laser: a pilot study / J.M. Spencer, R. Nossa, J. Ajmeri. – Текст : непосредственный // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2002. – V. 46. – P. 727-731.

- 30) Treatment of vitiligo using targeted UVB-Intense Pulsed Light (IPL)-phototherapy: Evaluation of variables affecting therapeutic success / A. Hartmann, A. Schmidt-Habel, L. Löhberg [et al.]. – Текст : непосредственный // European Journal of Dermatology. – 2014. – V.24. – P. 551-559.
- 31) Dell'Anna, M. L. Antioxidants and narrow band-UVB in the treatment of vitiligo: a double-blind placebo controlled trial / M.L. Dell'Anna, A. Mastrofrancesco, R. Sala, [et al.]. – Текст : непосредственный // Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology. – 2007. – V. 32. – P. 631-636.
- 32) Taneja, A. 308-nm excimer laser for the treatment of localized vitiligo / A. Taneja, M. Trehan, C.R. Taylor. – Текст : непосредственный // International journal of dermatology. – 2003. – V. 42. – P. 658-662.
- 33) Choi, K. Treatment of Vitiligo with 308-nm xenon-chloride excimer laser: therapeutic efficacy of different initial doses according to treatment areas / K. Choi, J. Park, Y. Ro. – Текст : непосредственный // The Journal of dermatology. – 2004. – V. 31. – P. 284-292.
- 34) Passeron, T. Physiopathology and genetics of vitiligo / T. Passeron, J.-P. Ortonne. – Текст : непосредственный // Journal of autoimmunity. – 2005. – V. 25. – P. 63-68.
- 35) Topical tacrolimus and the 308-nm excimer laser: a synergistic combination for the treatment of vitiligo / T. Passeron, N. Ostovari, W. Zakaria [et al.]. – Текст : непосредственный // Archives of dermatology. – 2004. – V. 140. – P. 1065-1069.
- 36) Treatment of vitiligo with the 308 nm excimer laser / M. Esposito, R. Soda, A. Costanzo, S. Chimenti. – Текст : непосредственный //

- Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology. – 2004. – V.29. – P. 133-137.
- 37) Combined excimer laser and topical tacrolimus for the treatment of vitiligo: a pilot study / A.Z. Kawalek, J.M. Spencer, R.G. Phelps. – Текст : непосредственный // Dermatologic surgery. – 2004. – V. 30. – P. 130-135.
- 38) Hong, S.-B. Short-term effects of 308-nm xenon-chloride excimer laser and narrow-band ultraviolet B in the treatment of vitiligo: a comparative study / S.-B. Hong, H.-H. Park, M.-H. Lee. – Текст : непосредственный // Journal of Korean medical science. – 2005. – V.20. – P. 273.
- 39) The efficacy of excimer laser (308 nm) for vitiligo at different body sites / A. Hofer, A.S. Hassan, F.J. Legat [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2006. – V. 20. – P. 558-564.
- 40) Xenon chloride ultraviolet B laser is more effective in treating psoriasis and in inducing T cell apoptosis than narrow-band ultraviolet B / Z. Novák, B. Bonis, E. Baltas [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2002. – V. 67. – P. 32-38.
- 41) Keller, U. Ultrafast all-solid-state laser technology / U. Keller. – Текст : непосредственный // Applied Physics B. – 1994. – V. 58. – P. 347-363.
- 42) Spence, D. E. 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser / D.E. Spence, P.N. Kean, W. Sibbett. – Текст : непосредственный // Optics letters. – 1991. – V. 16. – P. 42-44.
- 43) Semiconductor saturable absorber mirrors (SESAM's) for femtosecond to nanosecond pulse generation in solid-state lasers / U. Keller, K.J. Weingarten, F.X. Kartner [et al.]. – Текст :

- непосредственный // IEEE Journal of selected topics in QUANTUM ELECTRONICS. – 1996. – V. 2. – P. 435-453.
- 44) Radiation effects in LiYF₄ / G.M. Renfro, L.E. Halliburton, W.A. Sibley, R.F. Belt. – Текст : непосредственный // Journal of Physics C: Solid State Physics. – 1980. – V. 13. – P. 1941.
- 45) Lim, K.-S. Optical gain and loss studies in Ce³⁺: YLiF₄ / K.-S. Lim, D.S. Hamilton. – Текст : непосредственный // JOSA B. – 1989. – V. 6. – P. 1401-1406.
- 46) Possibilities of upconversion UV and VUV lasers based on 5d-4f transitions of rare-earth ions in wide-bandgap dielectric crystals / V. V. Semashko, M.-F. Joubert, E. Descroix [et al.] ; IRQO'99: Quantum Optics : International Society for Optics and Photonics, 2000. – 306-316 p. – Текст : непосредственный.
- 47) Supino, R. MTT assays / R. Supino // In vitro toxicity testing protocols : Springer, 1995. – 137-149 p. – Текст : непосредственный.
- 48) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann. – Текст : непосредственный // Journal of immunological methods. – 1983. – V. 65. – P. 55-63.
- 49) Pozarowski, P. "Flow cytometry of apoptosis: Current protocols in cell biology : P. Pozarowski, J. Grabarek, Z. Darzynkiewicz. – Москва : Юрайт, 2003. – 18 p. – Текст : непосредственный.