

ВЛИЯНИЕ КРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ ПОЛЯРИЗАЦИИ НА ДЕГИДРАТАЦИОННУЮ САМООРГАНИЗАЦИЮ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДИМЕГИНА

Брилль Г.Е., Егорова А.В., Бугаева И.О., *Постнов Д.Э., *Правдин А.Б.,
Пономарев Г.В., *Гаспарян Л.В., ****Макела А.М.

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского,
410012 Россия, г. Саратов, ул. Бол. Казачья, 112, тел.: +7(8452)66-97-52, e-vail: gbrill@yandex.ru

*Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, г. Саратов, Россия;

**НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, г. Москва, Россия;

***EMRED Oy, г. Хельсинки, Финляндия;

****ABER институт, г. Хельсинки, Финляндия

Проведён сравнительный анализ влияния излучения красного лазера (λ – 660 нм, 1 Дж/см², 9 Дж/мл) с линейной, циркулярной левой и правой поляризацией на процесс спонтанной самоорганизации димегина (10 мг/мл) в 0,9% растворе натрия хлорида в стандартных условиях (37°C, 30 мин). Использован метод клиновидной дегидратации с компьютерной обработкой изображения. Установлено, что характер влияния лазерного излучения на исследуемый процесс зависит от типа поляризации лазерного луча.

Ключевые слова: димегин, клиновидная дегидратация, самоорганизация, лазерное излучение, поляризация.

Цель работы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является эффективным методом лечения как опухолевых, так и неопухолевых заболеваний. При разрушении опухолевой ткани используют значительные дозы и плотности мощности лазерного излучения (ЛИ). Для неразрушающей ФДТ, применяемой для лечения воспалительных заболеваний и уничтожения микроорганизмов, характеристики облучения как минимум на порядок ниже [3], однако четкие критерии, опираясь на которые можно было бы подбирать дозы и режимы облучения, оптимальные для достижения желаемого клинического эффекта, отсутствуют.

При ФДТ критическими параметрами лазерного излучения являются длина волны, которая должна совпадать с максимумом поглощения фотосенсибилизатора (ФС), и выходная мощность, которая должна быть достаточна для разрушения объекта воздействия. Другие параметры лазерного излучения, в частности характер и степень его поляризации, обычно не контролируются; этим характеристикам не придают значения, хотя по вопросу об их влиянии на результат воздействия в литературе имеются противоречивые суждения [1, 5].

Следует, однако, принять во внимание, что большинство используемых в настоящее время ФС являются хиральными молекулами, т. е. содержат в своей структуре асимметричные атомные группировки. Последнее позволяет предполагать различие фотоотклика молекул ФС на свет, поляризованный различным образом. Это предположение послужило основанием для настоящего исследования, **цель** которого - сравнительный анализ модифицирующего влияния низкоинтенсивного ЛИ с различным характером поляризации на процесс спонтанного структурообразования гидрофильного ФС димегина.

Материал и методы исследования

Димегин [2,4-ди(1-метоксиэтил)-дейтеропорфирина IX динариевая соль] разводили *ex tempore* в 0,9% растворе натрия хлорида (10 мг/мл). Приготовленный раствор димегина делили на 4 пробы: одна являлась контролем, а три другие подвергались воздействию лазерного излучения с различным типом поляризации. Раствор димегина (200 мкл) помещали в ячейку планшета для культуры клеток и облучали красным светом полупроводникового лазера фирмы EMRED Oy (Финляндия) (длина волны λ = 660 нм,

поверхностная плотность дозы энергии – 1 Дж/см²,
объемная плотность дозы - 9 Дж/мл).

Три различных состояния поляризации пучка ЛИ получали с помощью четвертьволновой пластинки, изготовленной из слюды. Исходя из величины двулучепреломления ($n_e - n_o$) одноосного кристалла слюды для данной длины волны, рассчитали толщину пластинки, которая составила 34 мкм. Был изготовлен ряд пластинок, из которых отобрали одну, дающую минимальную эллиптичность при получении циркулярно-поляризованного света. Величина эллиптичности позволяет рассчитать вклад «целевой» и «не целевой» циркулярно-поляризованных компонент (в идеальном случае имеет место 100% конверсия интенсивности линейно поляризованного света в «целевую» компоненту) в суммарную интенсивность пучка, прошедшего через четвертьволновую пластинку; в нашем случае фазовая пластинка позволяла получить пучок с содержанием «целевой» компоненты не менее 99%.

Четвертьволновая пластинка была установлена в специальную насадку, монтирующуюся на корпусе лазера и имеющую возможность вращаться вокруг оси пучка лазерного излучения. На выходе лазера была установлена коллимирующая линза, которая уменьшала расходимость пучка таким образом, что световое пятно полностью покрывало площадь полистиреновой кюветы, находящейся на расстоянии ≈ 15 см от выходного отверстия насадки.

Так как было обнаружено, что исходный пучок лазерного излучения частично деполаризован, в схему был дополнительно введен пленочный поляроид, который делал соотношение $n_{||} : n_{\perp}$ (в линейно поляризованном пучке, падающем на поворотную фазовую пластинку) не хуже, чем 500 : 1. При таком положении четвертьволновой пластинки, когда направление оптической оси в ней параллельно плоскости поляризации пучка лазерного излучения (или перпендикулярно ему), выходящий из насадки луч имеет линейную поляризацию. При повороте пластинки на 45° выходящий луч циркулярно поляризован, при повороте на 45° в противоположную (относительно положения, соответствующего линейной поляризации) сторону выходящий пучок также циркулярно поляризован, но с противоположным направлением вращения вектора E.

Точное состояние циркулярной поляризации (лево- или правополяризованный луч) для двух различных «повернутых» положений фазовой пластинки было определено с помощью стандартной четвертьволновой пластины с нанесенными направлениями N_p и N_g . Таким образом,

на лимб поворотной насадки были нанесены три деления, при установке на которые выходящий луч был поляризован различным образом: влево по кругу, линейно, вправо по кругу. Изменения интенсивности пучка при смене состояния поляризации не превышали 1%.

Для изучения процесса структурной самоорганизации димегина использовали метод клиновидной дегидратации [4], основанный на исследовании структурного следа (фации), формирующегося при высыхании капли препарата в стандартных условиях. 2 мкл раствора димегина наносили на чистое, сухое, обезжиренное предметное стекло, которое в строго горизонтальном положении помещали в термостат и высушивали при 37°C в течение 30 мин. После высыхания препараты просматривали под микроскопом (Carl Zeiss, Jena) с видеоокулярюм DCM 510 (5 Мп) при конечном увеличении от 34 до 164 раз. Изображение сохраняли в базе данных компьютера.

Имидж-анализ фаций включал их качественную характеристику и расчет количественных показателей по специальной программе, составленной профессором Саратовского государственного университета Д.Э.Постновым. При обработке фаций рассчитывали следующие параметры.

S_1 – площадь ободка, нормированная на общую площадь фации; S_2 – площадь промежуточной зоны, нормированная на общую площадь фации; S_3 – площадь центральной зоны, нормированная на общую площадь фации; $Sh_{2/1}$ – смещение центра промежуточной зоны относительно центра ободка фации; $Sh_{3/1}$ – смещение центра центральной зоны относительно центра ободка фации. В типичном фрагменте каждой зоны фации рассчитывались: N – количество гребешков; AS (average size) – средний размер гребешков; $Entr.$ – коэффициент неоднородности поверхности фации; $D_{corr.}$ – корреляционная (фрактальная) размерность. В каждой серии экспериментов анализировали 6-8 фаций.

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета программ GraphPad Prism 4.02. Рассчитывали среднюю арифметическую вариационного ряда (M) и ошибку средней арифметической (m). Множественные сравнения проводили по программам One-way ANOVA, используя поправку Ньюмена-Кейлса. Достоверность межгрупповых различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Контрольные фации, получаемые при высыхании необлученного лазером раствора димегина

в наших стандартных условиях, имели округлую форму с четко представленными тремя зонами: ободковой, промежуточной и центральной (рис. 1А, Б). Ободок на основном протяжении был мало структурирован, лишь в отдельных его областях выявлялись мелкие поперечные трещины. В промежуточной зоне имелись множественные короткие, радиально ориентированные ветвистые образования, упирающиеся в поперечные аркады, так что вся эта зона напоминала волнистую густую крону дерева. В непосредственной близости от ободка ветвистые элементы становились менее отчетливыми и приобретали ббльшую равномерность. В центральной зоне выявлялись более крупные ветвистые образования (дендритно-осевые

элементы), содержащие основную ось с отходящими от нее под углом 90° боковыми ветвями.

Количественные параметры, характеризующие фации в контрольных образцах, представлены в табл. 1.

Облучение раствора димегина линейно-поляризованным светом приводило к существенным качественным изменениям структуры фаций (рис. 1В, Г). Наблюдалось значительное расширение ободковой зоны и появление в ней крупных продольных трещин. Уменьшалась плотность пространственного распределения элементов, составляющих промежуточную зону, утрачивалась их структурная четкость. Происходила деструктуризация центральной части фации, заключающаяся в практически пол-

Таблица 1

Результаты статистической обработки количественных показателей имидж-анализа фаций, полученных при дегидратации раствора димегина в 0,9% NaCl, в контроле и после воздействия красным ЛИ с различным типом поляризации

| Показатели | Контроль | Тип поляризации ЛИ | | |
|---------------------|---------------|---------------------------|---|---|
| | | Линейная | Циркулярная левая | Циркулярная правая |
| S ₁ | 0,169±0,009 | 0,2367±0,004 p < 0,01 | 0,1713±0,02 p > 0,5 p ₁ < 0,05 | 0,159±0,01 p > 0,5 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,5 |
| S ₂ | 0,729±0,0116 | 0,763±0,004 p > 0,05 | 0,827±0,02 p < 0,05 p ₁ > 0,05 | 0,75±0,01 p > 0,5 p ₁ > 0,5 p ₂ > 0,05 |
| S ₃ | 0,101±0,0029 | 0,098±0,002 p > 0,5 | Отсутствует центральная зона | 0,105±0,007 p > 0,5 p ₁ > 0,5 |
| Sh _{2/1} | 0,0074±0,0028 | 0,003±0,0007 p < 0,05 | 0,02±0,01 p > 0,2 p ₁ < 0,001 | 0,011±0,0008 p > 0,1 p ₁ > 0,2 p ₂ > 0,2 |
| Sh _{3/1} | 0,0177±0,0025 | 0,0432±0,001 p < 0,001 | Отсутствует центральная зона | 0,0348±0,005 p < 0,01 p ₁ > 0,2 |
| Периферическая зона | | | | |
| N | 141±35 | 520±77,3 p < 0,01 | 242,4±46 p < 0,05 p ₁ < 0,05 | 361±132 p < 0,05 p ₁ > 0,2 p ₂ < 0,05 |
| AS | 12,2±3,0 | 20,58±7,0 p > 0,1 | 358±81,4 p < 0,001 p ₁ < 0,001 | 157,2±91,2 p < 0,001 p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,05 |
| Entr. | 0,037±0,0042 | 0,042±0,006 p > 0,2 | 0,335±0,04 p < 0,001 p ₁ < 0,001 | 0,1±0,01 p < 0,01 p ₁ < 0,01 p ₂ < 0,05 |
| Dcorr. | 1,778±0,126 | 1,788±0,03 p > 0,5 | 1,89±0,04 p > 0,2 p ₁ > 0,2 | 1,778±0,08 p > 0,5 p ₁ > 0,2 p ₂ > 0,2 |

Таблица 1 (продолжение)

| Центральная зона | | | | |
|--------------------|--------------|------------------------|-----------------------|---|
| N | 143±21 | 241±19 p < 0,05 | Деструктуриза- ция | 75±19,16 p < 0,05 p ₁ < 0,001 |
| AS | 120,5±29,4 | 33,06±13,7 p < 0,02 | Деструктуриза- ция | 306,3±60,6 p < 0,02 p ₁ < 0,02 |
| Entr. | 0,155±0,0192 | 0,092±0,008 p > 0,2 | Деструктуриза- ция | 0,172±0,01 p > 0,5 p ₁ < 0,001 |
| Dcorr. | 1,824±0,0291 | 1,807±0,04 p > 0,5 | Деструктуриза- ция | 1,87±0,03 p > 0,2 p ₁ > 0,2 |
| Промежуточная зона | | | | |
| N | 97±23 | 246±68 p < 0,01 | Деструктуриза- ция | 166±34,1 p > 0,05 p ₁ > 0,2 |
| AS | 275,6±85,5 | 89,01±15,7 p < 0,05 | Деструктуриза- ция | 202±99 p > 0,5 p ₁ > 0,2 |
| Entr. | 0,138±0,0170 | 0,1888±0,02 p > 0,1 | Деструктуриза- ция | 0,109±0,01 p > 0,05 p ₁ < 0,01 |
| Dcorr. | 1,839±0,0341 | 1,844±0,01 p > 0,5 | Деструктуриза- ция | 1,762±0,05 p > 0,2 p ₁ > 0,1 |

Примечание: p – достоверность различий с контролем; p₁ – достоверность различий с линейной поляризацией; p₂ – достоверность различий с циркулярной левой поляризацией.

ном исчезновении линейных дендритно-осевых структур. В центральной и промежуточной зонах отмечалось появление участков разрежения (пустот), имеющих различные размеры и форму.

При количественном анализе фации, получаемые при облучении димегина линейно-поляризованным светом, различались с контрольными образцами по большинству параметров (см. табл. 1): в 1,4 раза увеличивалась площадь ободковой зоны фации (p<0,01). Достоверно изменялся показатель, характеризующий смещение центра центральной зоны относительно центра ободка фации (p<0,001), а также показатель, отражающий взаимное расположение центров промежуточной и периферической зон (p<0,05). Существенно увеличивалось количество гребешковых объектов во всех трех зонах фации: в периферической – в 3,7 раза (p<0,01), в центральной – в 1,7 раза (p<0,05), в промежуточной – в 2,5 раза (p<0,01). Увеличение количества объектов в центральной и промежуточной областях происходило на фоне уменьшения их среднего размера - соответственно в 3,6 (p<0,02) и в 3 раза (p<0,05).

Облучение раствора димегина красным лазерным излучением с правым направлением циркулярной поляризации приводило к образованию фаций, сходных по форме и структуре с контролем (рис. 2B,

Г). Однако после фотовоздействия значительно возросла структурная неоднородность ободка фации, где отмечалось появление длинных продольных трещин. В центральной зоне сохранялись короткие дендритно-осевые структуры правильной формы с отходящими от основной оси под углом 90° линейными дендритными ответвлениями. Значительную площадь промежуточной зоны занимали радиально ориентированные ветвистые элементы. Вблизи ободка их сменяли тонкие слоистые структуры.

Количественный анализ изображений этих фаций (см. табл. 1) выявил достоверное изменение показателя, характеризующего смещение центра центральной зоны относительно центра ободка фации (p<0,01). В периферической зоне почти в 13 раз увеличивался средний размер гребешковых объектов (p<0,001) при увеличении их количества в 2,5 раза (p<0,05), и на 37% возросла структурная неоднородность поверхности фации (p<0,01). На 48% уменьшалось количество объектов в центральной зоне (p<0,05), что сопровождалось достоверным увеличением их среднего размера по сравнению с контролем (p<0,02).

Облучение раствора димегина циркулярно-поляризованным лазерным излучением левого направления вращения приводило к наиболее существенной

модификации процесса спонтанного структурообразования (рис. 2А, Б). В ободковой зоне отмечалось появление многочисленных продольных, поперечных и аркадных трещин. Центральная и промежуточная зоны четко не дифференцировались. В околоободковой зоне можно было наблюдать необычные мелковетвистые образования. Центральная зона фации характеризовалась наличием крупных глыбчатых структур, между которыми располагались участки разрежения (пустоты) гигантского размера и различной формы.

Количественный анализ этих изображений выявил некоторое увеличение площади промежуточной зоны фаций (на 13%, $p < 0,05$). В периферической зоне в 30 раз возрастал средний размер гребешковых объектов ($p < 0,001$) при увеличении их количества в 1,7 раза ($p < 0,05$), и в 10 раз ($p < 0,001$) повышался показатель, отражающий структурную неоднородность поверхности фации. Получение иных количественных параметров фации было затруднено в связи с деструктуризацией значительной части ее поверхности.

Сравнительный анализ фаций, получаемых при облучении раствора димегина циркулярно-поляризованным лазерным излучением левого и правого направления, позволил выявить различия по многим параметрам (см. значения p_2 в табл. 1). Наиболее существенное качественное различие касалось деструктуризации центральной и промежуточной зон фации с появлением «пустот» и крупных глыбок, наблюдавшихся после облучения раствора димегина циркулярно-поляризованным светом с левым направлением вращения. Достоверные различия отмечены по количеству, среднему размеру и структурной неоднородности объектов периферической зоны.

Существенные различия в структуре фаций наблюдались и при сравнительном анализе образцов, полученных при облучении линейно-поляризованным и циркулярно-левополяризованным лазерным излучением (см. p_1 в 4-м столбце табл. 1).

Наиболее значимым качественным различием было усугубление процессов деструктуризации, которое наблюдалось при облучении раствора димегина циркулярно-поляризованным светом с левым направлением вращения. Достоверно различались площади периферических зон фаций, взаиморасположение центров периферической и промежуточной зон, средний размер, число объектов и степень их структуризации в ободковой зоне.

Значимые различия были обнаружены при сравнительном анализе эффектов право-поляризованного и линейно-поляризованного лазерного излучения (см. p_1 в 5-м столбце табл. 1). В данном случае различия касались размеров ободковой зоны фации, среднего размера объектов периферической и центральной зон фации, а также показателя Ent. периферической, промежуточной и центральной зон.

Выводы

Влияние циркулярно-поляризованного красного лазерного излучения с различным направлением поляризации на процесс структуризации димегина не одинаково. Наиболее существенные различия в структуре фаций наблюдаются при облучении линейно-поляризованным и циркулярно-левополяризованным светом, а также при облучении раствора димегина циркулярно-поляризованным светом левого и правого направления. Значительно меньше различий обнаружено при сравнении эффектов правополяризованного и линейно-поляризованного света.

Это наводит на мысль о необходимости проведения сравнительного анализа результатов использования лазерного излучения с различным типом поляризации при проведении ФДТ, поскольку можно ожидать не только количественных различий в выходе фотопродуктов, но и неоднотипных изменений биохимической активности самого ФС. Для димегина это может касаться его способности активировать гуанилатциклазу [2].

Литература

1. Бриль Г.Е. О возможной роли характера поляризации лазерного излучения в реализации его биологических эффектов / Г.Е.Бриль, К.В.Агаджанова, С.В.Логинская и др. // Материалы XXXIV Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии». – Судак, 2010. – С.195-198.
2. Северина И.С. УС-1-аналогичное потенцирование NO-зависимой активации растворимой гуанилатциклазы производными протопорфирина IX / И.С.Северина, Н.В.Пятакова, А.Ю.Щеголев, Г.В.Пономарев // Биохимия. – 2006. – Т.71, вып. 3. – С.426-431.
3. Странадко Е.Ф. Фотодинамическое воздействие

- на патогенные микроорганизмы (Современные проблемы антимикробной фотодинамической терапии) / Е.Ф.Странадко, И.Ю.Кулешов, Г.И.Караханов // Лазерная медицина. – 2010. – Т.14, вып.2. – С.52-59.
4. Шабалин В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н.Шабалин, С.Н.Шатохина. – М.: Хризостом, 2001. – 303 с.
5. Karu T.I. Elementary processes in cells after light absorption do not depend on the degree of polarization: implications for the mechanisms of laser phototherapy / T.I.Karu, L.V.Pyatibrat, S.V.Moskvin et al. // Photomed. Laser Surg. – 2008. – Vol.26. – P.77-82.

**ВПЛИВ ЧЕРВОНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ З РІЗНИМ ТИПОМ
ПОЛЯРИЗАЦІЇ НА ДЕГІДРАТАЦІЙНУ САМООРГАНІЗАЦІЮ
ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРА ДИМЕГІНА**

Брілль Г.Є., Єгорова А.В., Бугаєва І.О., *Постнов Д.Е., *Правдін А.Б.,
Пономарьов Г.В., *Гаспарян Л.В., ****Макела А.М.
Саратовський державний медичний університет імені В.І.Разумовського,
*Саратовський державний університет імені Н.Г.Чернишевського,
**Науково-дослідний інститут біомедичної хімії імені В.Н.Ореховича, г. Москва,
***EMRED Oy, Гельсінкі, Фінляндія,
****ABER інститут, Гельсінкі, Фінляндія

Проведено порівняльний аналіз впливу випромінювання червоного лазера (λ -660 нм, 1 Дж/см², 9 Дж/мл) з лінійною, циркулярною лівою та правою поляризацією на процес спонтанної самоорганізації димегіна (10 мг/мл) в 0,9% розчині натрію хлориду в стандартних умовах (37°C, 30 мин.). Використано метод клиноподібної дегідратації з комп'ютерною обробкою зображення. Встановлено, що характер впливу лазерного випромінювання на досліджуєми процес залежить від типу поляризації лазерного променя.

Ключові слова: димегін, клиноподібна дегідратація, самоорганізація, лазерне випромінювання, поляризація.

**EFFECT OF LASER RADIATION OF RED BAND OF SPECTRUM WITH DIFFERENT
TYPES OF POLARIZATION ON DEHYDRATION SELF-ORGANIZATION
OF PHOTOSENSITIZER DIMEGIN**

Brill G.E., Egorova A.V., Bugaeva I.O., *Postnov D.E., *Pravdin A.B.,
Ponomaryov G.V., *Gasparyan L.V., ****Makela A.M.
V.I. Razumovsky State Medical University, Saratov, Russia;
Chernyshevsky N.G. State University, Saratov, Russia;
V.N. Orechovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Russia; ⁴EMRED Oy, Helsinki, Finland,
⁵ABER Institute, Helsinki, Finland

Comparative analysis of influence of red laser radiation (λ – 660 nm, 1 J/cm², 9 J/mL) with linear, circular left and circular right polarization on the process of spontaneous self-organization of dimegin saline solution at standard conditions (37°C, 30 min) was performed. Method of wedge-shaped dehydration with computer image-analysis was used. It was established that laser radiation modifies the process of dimegin solution self-organization and this effect depends on the type of laser beam polarization.

Keywords: dimegin, wedge-shaped dehydration, self-organization, laser radiation, polarization.