

Эффективность генерации синглетного кислорода экстрактами лекарственных растений для фотоинактивации микроорганизмов

А. В. Микулич¹, А. И. Третьякова¹, А. Н. Собчук¹, Т. С. Ананич¹, Л. Г. Плавская¹, Р. К. Нагорный¹, О. Н. Дудинова¹, И. А. Леусенко¹, В. Ю. Плавский¹, Tran Quoc Tien², Quang Cong Tong², Thanh-Phuong Nguyen³

¹Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь;
e-mail: a.mikulich@ifanbel.bas-net.by

²Институт материаловедения, ВАНТ, Ханой, Вьетнам;

³Школа инженерной физики Ханойского университета науки и технологий, Ханой, Вьетнам

Показано, что экстракты лекарственных растений (жидкий экстракт из смеси цветков ромашки аптечной и календулы лекарственной, травы тысячелистника обыкновенного (коммерческое название «Ротатит»); препарат на основе травы зверобоя продырявленного; препарат из листьев эвкалипта прутовидного) являются эффективными генераторами синглетного кислорода и способны выступать в качестве фотосенсибилизаторов. Подтверждением способности указанных многокомпонентных экстрактов к генерации синглетного кислорода при оптическом возбуждении в полосы их поглощения является регистрация люминесценции синглетного кислорода в области $\lambda = 1270$ нм, интенсивность которой резко снижается при добавлении тушителя синглетного кислорода – азида натрия. Относительным методом определены квантовые выходы генерации синглетного кислорода экстрактами в 96 % этаноле.

Ключевые слова: экстракты лекарственных растений, синглетный кислород, люминесценция, азид натрия, фотосенсибилизированная инактивация микроорганизмов

Введение

В настоящее время технологией, доказавшей свою высокую эффективность в борьбе с патогенной микрофлорой, является сочетанное действие фотоактивного соединения (фотосенсибилизатора) и оптического излучения, соответствующего спектру его поглощения – фотосенсибилизированная инактивация микроорганизмов или антимикробная фотодинамическая терапия. При этом взаимодействие фотосенсибилизатора и оптического излучения в присутствии молекулярного кислорода приводит к деструкции патогенов за счет инициирования фотохимических реакций, предполагающих участие активных форм кислорода: например, супероксид анион-радикала и гидроксильного радикалов (механизм типа I), синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) (механизм типа II). На эффективность фотоинактивации микроорганизмов может влиять ряд факторов, включающих в себя параметры оптического излучения, и, в особенности, тип фотосенсибилизатора. Используемые в настоящее время фотосенсибилизаторы обладают рядом недостатков, главными из которых являются их низкая биодоступность, сложность синтеза и дороговизна. На роль сенсбилизаторов, лишенных указанных недостатков, могут претендовать экстракты лекарственных растений.

Целью настоящей работы является исследование эффективности генерации синглетного кислорода экстрактами лекарственных растений с целью обоснования возможности их применения в качестве фотосенсибилизаторов.

Материалы и методы

Исследование эффективности генерации синглетного кислорода экстрактами лекарственных растений проводили для препаратов, приобретенных в аптечной сети: жидкий экстракт из смеси цветков ромашки аптечной и календулы лекарственной, травы тысячелистника обыкновенного на 65 % этаноле (коммерческое название «Ротатит»);

препарат на основе травы зверобоя продырявленного на 65 % этаноле; препарат из листьев эвкалипта прутовидного на 64 % этаноле.

В качестве параметра, определяющего эффективность генерации синглетного кислорода экстрактами лекарственных растений, был выбран квантовый выход генерации синглетного кислорода γ .

Генерация $^1\text{O}_2$ регистрировалась прямым методом путем измерения люминесценции $^1\text{O}_2$ в области $\lambda = 1270$ нм с использованием охлаждаемого жидким азотом ПЗС-детектора Symphony II спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Scientific, Франция). В канале регистрации дополнительно устанавливали оптический фильтр LP 1064, отсекающий излучение с длиной волны менее 1064 нм. Возбуждение генерации синглетного кислорода проводилось в кварцевых кюветах с длиной оптического пути $l = 10$ мм полупроводниковым лазером с длиной волны $\lambda = 665$ нм, мощностью $P = 85$ мВт, а также светодиодным источником с длиной волны $\lambda = 590$ нм, мощностью $P = 30$ мВт. Оптические оси возбуждения и регистрации составляли угол 90° .

Измерение квантового выхода γ проводилось относительным методом. Величина γ определялась по формуле (1):

$$\gamma = \gamma_0(S/S_0)(\beta_0/\beta), \quad (1)$$

где γ_0 – квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ эталонным соединением; S и S_0 – площади под кривыми спектров люминесценции $^1\text{O}_2$ для исследуемого и эталонного соединений, соответственно; β_0 и β – доли поглощенного возбуждающего света эталонным и исследуемым соединениями, соответственно.

Условия возбуждения образцов сохранялись идентичными для исследуемого и эталонного соединений. В качестве эталонного соединения использовали образец раствора метиленового синего в этаноле, для которого $\gamma_0 = 0,52$ [1]. Оптическая плотность (D) растворов экстрактов лекарственных растений, метиленового синего на длинах волн возбуждения $\lambda = 590$ нм и $\lambda = 665$ нм составляла $D = 0,20$. В качестве растворителя при проведении измерений квантового выхода генерации синглетного кислорода использовали 96 % этанол.

Результаты и обсуждение

Спектрально-люминесцентные исследования препаратов на основе экстрактов лекарственных растений показали, что их состав является многокомпонентным. Исследуемые экстракты характеризуются наличием выраженного поглощения в УФ-области, а также в видимой области спектра с характерным максимумом в области $\lambda = 665$ нм. Происхождение данной полосы, согласно выполненным нами ранее исследованиям [2], связано с присутствием в экстрактах хлорофиллов. Кроме полосы поглощения с максимумом в области $\lambda = 665$ нм, спектр поглощения препарата на основе травы зверобоя содержит полосы с максимумами в области $\lambda = 550$ нм и 590 нм, которые обусловлены присутствием в его составе еще одного фотосенсибилизатора – гиперицина.

На рисунке представлены спектры люминесценции синглетного кислорода при возбуждении экстрактов лекарственных растений и эталонных соединений излучением полупроводникового лазера с длиной волны $\lambda = 665$ нм в этаноле.

Рисунок показывает, что все исследуемые соединения при возбуждении в полосу их поглощения оптическим излучением с длиной волны $\lambda = 665$ нм способны генерировать синглетный кислород. Об этом свидетельствует наличие в спектрах люминесценции пика с максимумом в области $\lambda = 1270$ нм. Вместе с тем, следует отметить, что приведенные спектры представляют собой суперпозицию спектров

люминесценции синглетного кислорода и собственной люминесценции образцов. Для подтверждения генерации синглетного кислорода использовали тушитель $^1\text{O}_2$ – азид натрия (NaN_3). Добавление к исследуемым соединениям азиды натрия приводило к резкому снижению сигнала люминесценции в области $\lambda = 1270$ нм. При возбуждении оптическим излучением с длиной волны $\lambda = 590$ нм был также зарегистрирован спектр люминесценции синглетного кислорода с максимумом в области 1270 нм.

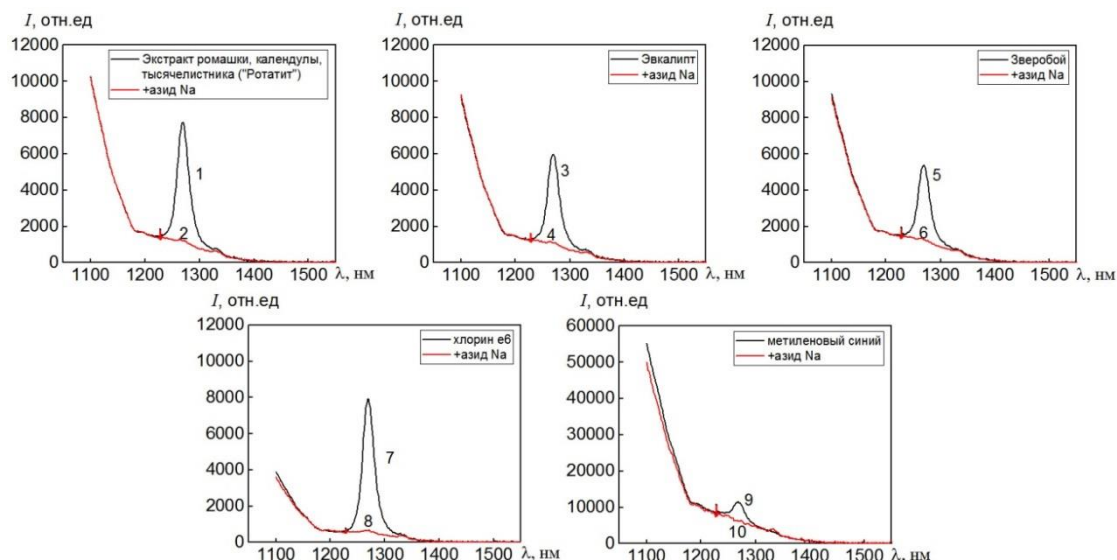


Рис. – Спектры люминесценции синглетного кислорода при возбуждении экстрактов лекарственных растений и эталонных соединений излучением полупроводникового лазера с длиной волны $\lambda = 665$ нм, мощностью $P = 85$ мВт в этаноле: 1, 2 – препарат «Ротатит»; 3, 4 – препарат из листьев эвкалипта прутовидного; 5, 6 – препарат на основе травы зверобоя продырявленного; 7, 8 – хлорин e_6 ; 9, 10 – метиленовый синий (2, 4, 6, 8, 10 – с добавлением азиды натрия (конечная концентрация в кювете – 10 мМ)).

Квантовые выходы генерации $^1\text{O}_2$ исследуемыми соединениями в этаноле приведены в таблице.

Табл. Квантовые выходы генерации $^1\text{O}_2$ исследуемыми соединениями в этаноле.

Соединение	Возбуждение $\lambda = 665$ нм	Возбуждение $\lambda = 590$ нм
Метиленовый синий	0,52	0,52
Хлорин e_6	0,71	-
Препарат «Ротатит»	0,64	-
Препарат на основе травы зверобоя продырявленного	0,40	0,16
Препарат из листьев эвкалипта прутовидного	0,48	-

Из табл. следует, что максимальное значение квантового выхода генерации синглетного кислорода среди экстрактов лекарственных растений регистрируется для препарата «Ротатит» ($\gamma = 0,64$, что больше, чем для стандарта – метиленового синего). Для контроля погрешности измерения квантовых выходов $^1\text{O}_2$, использовался образец хлорина e_6 в этаноле. Значение квантового выхода генерации $^1\text{O}_2$, полученное для

хлорина ϵ_6 ($\gamma = 0,71$), хорошо согласуется с литературными данными ($\gamma_0 = 0,65 \pm 0,06$) [3]. Обращает на себя внимание зависимость квантового выхода генерации синглетного кислорода γ от длины волны возбуждения для препарата на основе травы зверобоя. Вероятно, изменение длины волны возбуждения приводит к перераспределению вкладов фотосенсибилизаторов, входящих в состав препарата (а именно - хлорофиллов и гиперицина), в общий квантовый выход.

Заключение

Исследуемые экстракты лекарственных растений способны выступать в качестве фотосенсибилизаторов и эффективно генерировать синглетный кислород.

Благодарности

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект №Ф21ВТНГ-001) и Министерства науки и технологий Вьетнама (проект № NĐT.73BLR/19).

Литература

1. Redmond R. W., Gamlin J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* 1999. Vol. 70, No. 4. P. 391–475.
2. Плавский В. Ю., Третьякова А. И., Микулич А. В., Плавская Л. Г., Юдина Н. А., Пиванкова Н. Н., Русакевич П. С., Гришанович Р. В., Улащик В. С. Инновационные методы повышения противомикробной активности антибактериальных препаратов. *Инновационные технологии в медицине.* 2013. № 1. С. 127–137.
3. Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Shulga A., Mironov A., Efremova O, Bonnett R., Songca S.Phinda, Kassem M. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT. *J. Photochem. Photobiol B.* 1996. Vol. 33, No. 2. P. 171–180.

Generation efficacy of singlet oxygen by extracts of medicinal plants for photoinactivation of microorganisms

A.V. Mikulich¹, A.I. Tretyakova¹, A.N. Sobchuk¹, T.S. Ananich¹, L.G. Plavskaya¹, R.K. Nahorny¹, O.N. Dudinova¹, I.A. Leusenka¹, V.Yu. Plavskii¹, Tran Quoc Tien², Quang Cong Tong², Thanh-Phuong Nguyen³

¹*B.I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus;*

e-mail: a.mikulich@ifanbel.bas-net.by

²*Institute of Materials Science, VAST, Hanoi, Vietnam;*

³*School of Engineering Physics, Hanoi University of Science and Technology, Hanoi, Vietnam*

It is shown that extracts of medicinal plants (liquid extract from a mixture of flowers of *Matricaria chamomilla* and *Calendula officinalis*, *Achillaea millefolium* herb (commercial name "Rotatit"); a preparation from *Hypéricum perforátum*; a preparation from *Eucalypti viminalis folia*) are efficient generators of singlet oxygen and capable of acting as photosensitizers. Confirmation of ability of studied multicomponent extracts to generate singlet oxygen upon optical excitation in their absorption bands is the registered luminescence of singlet oxygen in the region of $\lambda = 1270$ nm with sharp decrease in its intensity upon the addition of a singlet oxygen quencher - sodium azide. The quantum yields of singlet oxygen generation by extracts in 96% ethanol were determined by a relative method.

Keywords: extracts of medicinal plants, singlet oxygen, luminescence, sodium azide, photosensitizing inactivation of microorganisms.