

Влияние оптического излучения синей области спектра и противоопухолевых фитохромных препаратов на выживаемость клеток в культуре

О. Н. Дудинова, Л. Г. Плавская, Т. С. Ананич, И. А. Леусенко, А. В. Микулич,
А. Н. Собчук, А. И. Третьякова, В. Ю. Плавский

*Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск;
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

Показано способность оптического излучения светодиодных источников синей области спектра с длиной волны $\lambda = 405$ и 440 нм оказывать влияние на рост раковых клеток глиомы мозга крысы С6 и клеток почечной ткани обезьяны ВGM в культуре. Инактивирующее действие света имеет дозозависимый характер и увеличивается по мере увеличения энергетической дозы. При одинаковой дозе инактивирующее действие излучения с $\lambda = 405$ нм более выражено. Величина фотобиологического эффекта незначительно (но достоверно) снижается при облучении клеток в присутствии тушителя синглетного кислорода азида натрия. Добавление в питательную среду клеток тушителя перекиси водорода пирувата натрия практически блокирует фотодинамическое действие. Предполагается, что фотоинактивация клеток синим светом обусловлена сенсibiliзирующим действием со стороны эндогенных соединений. Фотобиологический эффект усиливается в присутствии противоопухолевого фитохромного препарата куркумина и уменьшается при добавлении кверцетина и эпигенина, выполняющих функции антиоксидантов. Основной вклад в эффекты фотоинактивации клеток, при их сенсibiliзации куркумином вносит перекись водорода, образование которой инициировано генерацией синглетного кислорода при фотовозбуждении противоопухолевого препарата

Ключевые слова: светодиоды, противоопухолевые фитохромные препараты, куркумин, клетки

Введение

В настоящее время все большее распространение в клинической практике находят новые методы лечения, базирующиеся на достижениях фотохимии, фотобиологии и лазерной физики. Прогресс лазерной медицины привел к появлению принципиально новой технологии, используемой в лечении различных соматических заболеваний – фотодинамической терапии (ФДТ). Она основана на способности ряда лекарственных препаратов – фотосенсibiliзаторов – селективно накапливаться в тканях злокачественных опухолей, высокопролиферативных тканях и ряде микроорганизмов. Под действием оптического излучения, соответствующего спектру поглощения фотосенсibiliзатора, в клетках и тканях развиваются фотохимические реакции с образованием активных форм кислорода (в том числе синглетного кислорода) и свободных радикалов, что приводит к деструкции сенсibiliзированных субстанций и к их гибели. Одним из ключевых условий успешного применения ФДТ в клинической практике является правильный подбор фотосенсibiliзатора. При этом хорошо известно, что некоторые природные фитохромные препараты, являясь малотоксичными и биодоступными соединениями, способны выполнять функции фотосенсibiliзаторов и увеличивать чувствительность патогенных клеток к действию света.

Цель данной работы – изучение влияния излучения светодиодных источников синей области спектра и фитохромных препаратов «Куркумин», «Кверцетин», «Эпигенин» на клетки в культуре.

1. Материалы и методы

Действие оптического излучения в отсутствие и при сенсibiliзации куркумином, кверцетином и эпигенином исследовали в отношении раковых клеток глиомы мозга крысы С6 и клеток почечной ткани обезьяны ВGM в культуре. Клетки выращивали в одноразовых стерильных чашках Петри на питательной среде Игла

Дулбеко DME с 10%-ным содержанием сыворотки крупного рогатого скота при 37°C и 5 %-ным содержанием CO₂ в инкубаторе. В качестве источника излучения использовали светодиоды с длинами волн $\lambda = 405$ и 440 нм и плотностью мощности $P = 25$ и 50 мВт/см². На третьи сутки культивирования за 60 минут до облучения в культуру клеток вносили куркумин в концентрации 1, 2 или 5 мкМ. Для оценки участия активных форм кислорода в механизме фотодеструкции клеток за 30 мин до их облучения в культуру клеток вносили 10 мМ азида натрия (тушитель синглетного кислорода) или 10 мМ пирувата натрия (тушитель пероксида водорода). Результат воздействия оптического излучения и фотобиологический эффект за счет сенсibilизации клеток фитохромными препаратами, оценивали спектрофотометрическим методом через 24 ч после воздействия, контролируя метаболическую активность клеток с помощью колориметрического МТТ-теста.

2. Результаты и обсуждение

Выполненные исследования показали, что воздействие излучения синей области спектра с $\lambda = 405$ нм или 440 нм на клетки BGM и C6 приводит к их фотодеструкции без предварительного внесения экзогенных фотосенсibilизаторов (рис. 1 а, б). Эффект увеличивается с увеличением энергетической дозы. При одинаковой дозе инактивирующее действие излучения с $\lambda = 405$ нм более выражено. Величина фотобиологического эффекта незначительно (но достоверно) снижается при облучении клеток в присутствии азида натрия. В то время как добавление пирувата практически блокирует фотодинамическое действие (рис. 2). По нашему мнению, имеются основания полагать, что фотоинактивация клеток в культуре излучением синей области спектра обусловлена участием активных форм кислорода, генерируемых за счет возбуждения эндогенных фотосенсibilизаторов порфириновой и флавиновой природы. Вклад порфириновых фотосенсibilизаторов в фотоинактивацию клеток наиболее выражен при воздействии излучения 405 нм (рис. 1, кривые 2), которое соответствует максимуму полосы Сорс порфиринов, а флавиновых – при воздействии излучения 440 нм (рис. 1, кривые 1), что соответствует максимуму в спектре поглощения флавинов.

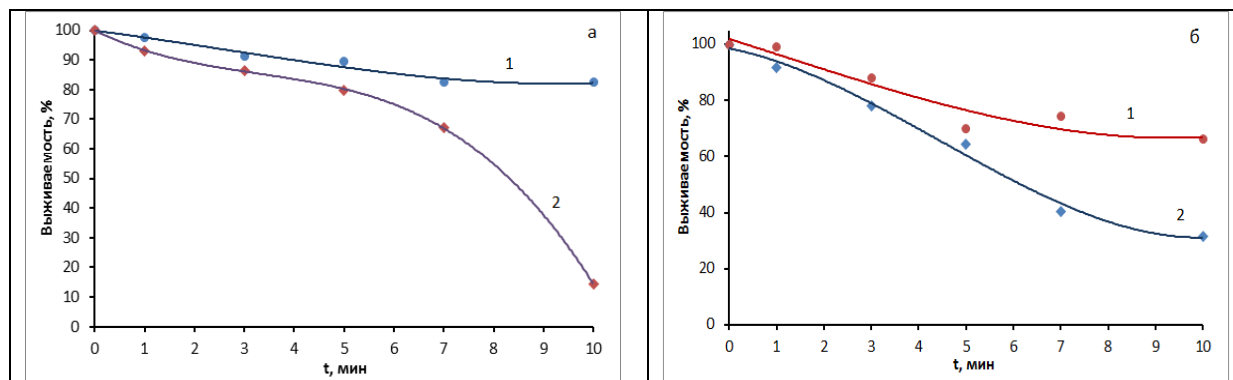


Рис. 1. – Зависимость выживаемости клеток BGM (а) и C6 (б) в процентах к контролю от времени воздействия излучения светодиодного источника с $\lambda = 440$ нм (1) и $\lambda = 405$ нм (2), плотностью мощности $P = 25$ мВт/см².

Эффект фотоинактивации усиливается при окрашивании клеток глиомы крысы C6 куркумином и последующем воздействии излучения $\lambda = 440$ нм, соответствующего полосе поглощения сенсibilизатора (рис. 2). Наблюдается увеличение фотобиологического действия при увеличении концентрации куркумина в ряду: 1, 2, 5 мкМ (диаграммы 4, 5, б). Тем не менее, это не исключает того факта, что в указанных условиях фотоинактивация клеток обусловлена за счет двух процессов: а) сенсibilизирующего действия куркумина; б) фотодинамического действия эндогенных соединений.

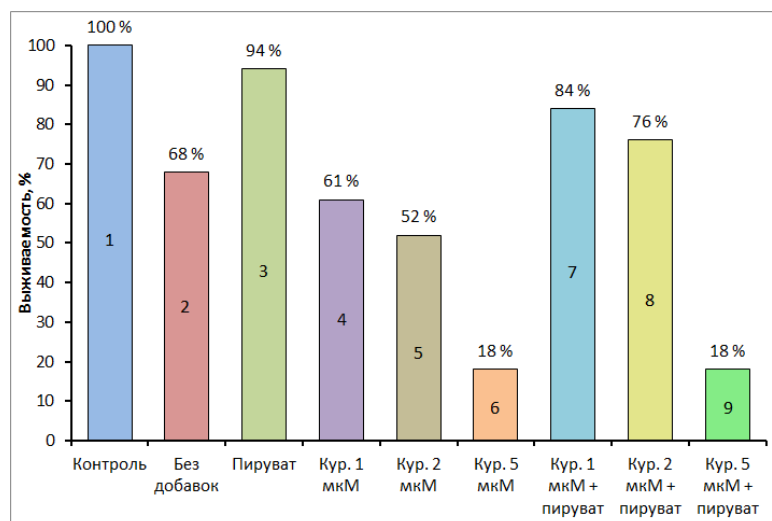


Рис. 2. – Выживаемость клеток С6 (в процентах к контролю) после облучения светодиодным источником с $\lambda = 440$ нм, плотностью мощности $P = 50$ мВт/см² в течение $t = 5$ мин: 1 – контроль без облучения; 2–9 – опытные группы: 2 – без добавок, 3 – в присутствии 10 мМ пирувата, 4, 5, 6 – в присутствии 1, 2, 5 мкМ куркумина, 7–9 – в присутствии куркумина и пирувата.

Добавление пирувата перед облучением клеток С6, окрашенных куркумином, ведет к существенному снижению эффективности их фотодеструкции (рис. 2, диаграммы 7, 8). Следовательно, определяющую роль в фотоинактивации клеток, сенсibilизированных куркумином, играет перекись водорода, образование которой инициировано генерацией синглетного кислорода сенсibilизаторами при их фотовозбуждении. Принципиальная способность куркумина генерировать синглетный кислород следует из впервые зарегистрированных нами спектров низкотемпературной фосфоресценции куркумина (рис. 3), на котором представлены также спектры возбуждения флуоресценции (кривая 1), флуоресценции (кривая 2), возбуждения фосфоресценции (кривая 3) и фосфоресценции (кривая 4) куркумина в 2-метилтетрагидрофуране (2-МГТФ) при 77 К.

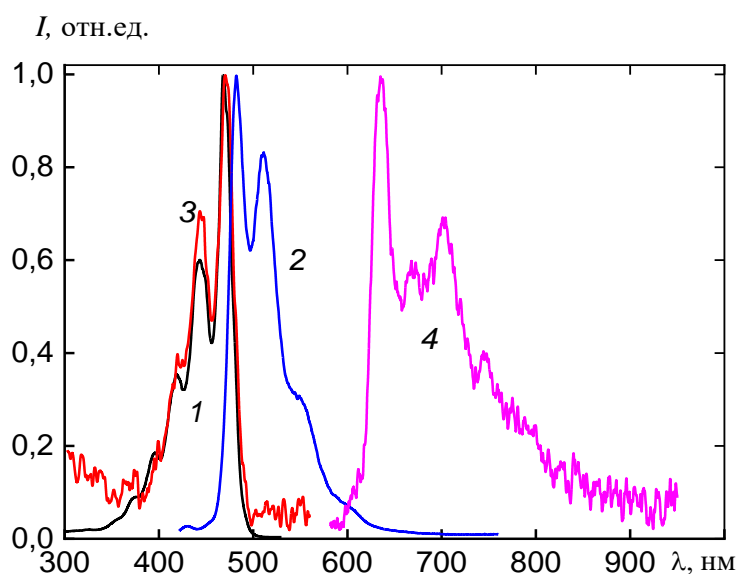


Рис. 3. – Спектр возбуждения флуоресценции (1), флуоресценции (2), возбуждения фосфоресценции (3), фосфоресценции (4) куркумина в 2-МГТФ при 77 К.

Видно, что при температуре жидкого азота фосфоресценция куркумина в 2-МГТФ характеризуется максимумом при 636 нм, а спектр возбуждения фосфоресценции соответствует спектру возбуждения флуоресценции в данном растворителе. Это позволяет констатировать принадлежность зарегистрированного спектра испусканию с триплетного T_1 -уровня куркумина. Установлено, что длительность затухания фосфоресценции в 2-МГТФ составляет $\tau = 4,4$ мс. Как следует из представленных данных, энергетически триплетный T_1 -уровень куркумина расположен выше соответствующего S_1 -уровня синглетного кислорода ($E_\Delta = 94,3$ кДж/моль), что обеспечивает возможность генерации его данной активной формы. Действительно, выполненные люминесцентные исследования с регистрацией фосфоресценции синглетного кислорода в области 1268 нм подтвердили способность куркумина генерировать 1O_2 в ряде органических растворителей с квантовым выходом $\phi_\Delta \approx 0,1$.

Выполненные исследования показали, что, в отличие от куркумина, другие противоопухолевые фитохромные препараты (кверцетин, эпигенин) выступают в качестве антиоксидантов: их добавление в питательную среду клеток снижает фотобиологический эффект, инициированный эндогенными фотосенсибилизаторами.

Заключение

Излучение синей области спектра способно инактивировать опухолевые и нетрансформированные клетки в культуре. Фотобиологический эффект может усиливаться за счет сенсibilизации клеток противоопухолевым фитохромным препаратом куркумином и снижаться за счет антиоксидантного действия кверцетина.

Благодарности

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Ф21В-003).

Influence of optical radiation in the blue region of the spectrum and antitumor phytochromic drugs on the survival of cells in culture

O.N. Dudinova, L.G. Plavskaya, T.S. Ananich, I.A. Leusenka, A.V. Mikulich,
A.N. Sobchuk, A.I. Tretyakova, V. Yu. Plavskii

*B.I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk;
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by*

The ability of optical radiation of LED sources in the blue region of the spectrum with wavelength $\lambda = 405$ and 440 nm to influence the growth of rat brain glioma cancer cells and BGM monkey kidney tissue cells in culture was shown. The inactivating effect of light is dose-dependent and increases with increasing energy dose. At the same dose, the inactivating effect of radiation with $\lambda = 405$ nm is more pronounced. The magnitude of the photobiological effect slightly (but reliably) decreases when cells are irradiated in the presence of a singlet oxygen quencher, sodium azide. At the same time, adding pyruvate hydrogen peroxide quencher to the nutrient medium of cells practically blocks the photodynamic effect. It is assumed that the photoinactivation of cells by blue light is due to the sensitizing effect of endogenous compounds. The photobiological effect is enhanced in the presence of the antitumor phytochrome drug curcumin and decreases with the addition of quercetin and epigenin, which function as antioxidants. The main contribution to the effects of photoinactivation of cells upon their sensitization with curcumin is made by hydrogen peroxide, the formation of which is initiated by the generation of singlet oxygen upon photoexcitation of an antitumor drug.

Keywords: LEDs, anticancer phytochrome drugs, curcumin, cells.