

# Влияние излучения сине-зеленой области спектра на эритроциты человека в условиях *in vitro*

Ю. В. Крученок, О. Н. Дудинова, В. Ю. Плавский

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

Показано, что воздействие на суспензию эритроцитов излучения светодиодных источников синей ( $\lambda = 463$  нм) и зеленой ( $\lambda = 517$  нм) областей спектра приводит к повреждению клеточных мембран, контролируемому по выходу молекул гемоглобина. Основной вклад в повреждение вносят фотохимические реакции, сенсibilизированные эндогенными порфиринами, и в меньшей степени – флавинами, присутствующими в клетках в низких концентрациях. В отличие от светоиндуцированного гемолиза, отток ионов калия из эритроцитов (регулируемый ферментом  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой) в результате воздействия света изменяется незначительно. Установлено, что билирубин в концентрации, показанной для проведения фототерапии новорожденным с синдромом гипербилирубинемии (желтухи), способен снижать эффективность фотогомолиза (выступая в качестве антиоксиданта) и интенсифицировать светоиндуцированный отток из эритроцитов ионов калия (выступая в качестве фотосенсibilизатора).

**Ключевые слова:** эритроциты, светодиоды, фотогомолиз, эндогенные порфирины, билирубин

## Введение

Интерес к исследованию влияния оптического излучения сине-зеленой области спектра на клетки крови обусловлен появлением в последнее десятилетие доступных полупроводниковых лазерных и светодиодных источников, нашедших широкое применение для внутривенного воздействия на кровь (ВЛОК-терапия), а также для снижения уровня билирубина в крови новорожденных детей с синдромом гипербилирубинемии (желтухи) путем воздействия света на поверхность тела ребенка.

Цель настоящей работы – сравнительные исследования в условиях *in vitro* эффективности повреждения эритроцитов крови человека при воздействии излучения одинаковой интенсивности светодиодных источников синей и зеленой областей спектра как в отсутствие экзогенных фотосенсibilизаторов, так и при сенсibilизации клеток билирубином в концентрации, предполагающей проведение фототерапии у младенцев.

## Материалы и методы

Эритроциты выделяли из крови взрослых доноров произвольной группы и резус-фактора, полученной в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Билирубин вносили в суспензию эритроцитов в забуференном физиологическом растворе (ЗФР рН 7.4) до концентрации 171 мкМ (через 0.05 М NaOH) и инкубировали при 37°C в течение часа в темноте одновременно с контрольными суспензиями эритроцитов без билирубина. Для облучения суспензию эритроцитов разбавляли до гематокрита ~ 13 % физиологическим раствором 0.155 М NaCl. Аликвоты каждой суспензии подвергали воздействию синего или зеленого света в течение 20 минут. Через 40 минут после облучения половины облученных образцов, а также контрольных необлученных образцов идентичного им состава, центрифугировали 15 мин при 3000 g для осаждения эритроцитов и анализировали надосадочную жидкость. Вторые части всех образцов выдерживали в течение 18 часов в холодильнике при температуре 8 °C, и затем также осаждали в них эритроциты и использовали надосадочный раствор для анализа.

Источниками излучения выступали синие (длина волны максимума спектра испускания  $\lambda = 463$  нм,  $\Delta\lambda = 20$  нм) и зеленые ( $\lambda = 517$  нм,  $\Delta\lambda = 38$  нм) светодиодные матрицы, формирующие однородное по интенсивности световое пятно плотностью

мощности на уровне поверхности образцов  $I \approx 12$  мВт/см<sup>2</sup>. Воздействие светом осуществляли в течение 20 минут в слое толщиной 10 мм при медленном перемешивании суспензии, исключая механический гемолиз эритроцитов. Энергетическая доза при таком воздействии составляла  $D = 14.4$  Дж/см<sup>2</sup>, что примерно сопоставимо с 2 часами фототерапии при лечении гипербилирубинемии новорожденных детей.

Тестами, свидетельствующими о фотоповреждении эритроцитарной мембраны, служили данные о концентрациях ионов калия  $K^+$  и молекул гемоглобина в окружающем эритроциты растворе, который выделялся при центрифугировании суспензии. При анализе оттока ионов калия фотобиологический эффект характеризовали величиной  $[K^+_{ir}]/[K^+_{un}]$ , где  $[K^+_{ir}]$  и  $[K^+_{un}]$  – концентрации ионов  $K^+$  в надосадочной жидкости, выделяемой при центрифугировании облученных и необлученных контрольных суспензий эритроцитов, соответственно. Выход молекул гемоглобина из эритроцитов характеризовали величиной  $D_{ir}/D_{un}$ , представляющей собой отношение оптических плотностей в максимуме полосы Core ( $\lambda_{max} = 416$  нм) в надосадочной жидкости из облученных и необлученных суспензий эритроцитов, соответственно.

Анализ содержания ионов  $K^+$  в надосадочном растворе проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой (IRIS Intrepid II XDL DUO, Thermo Electron Corp., USA) с калибровкой по стандартному образцу состава водного раствора ионов калия 8092-97(18K-1). Наличие гемоглобина в растворе определяли спектрофотометрически. Спектры поглощения растворов измеряли на спектрофотометре Cary 500 Scan UV-Vis-NIR (Varian, USA) в 1-см кварцевых кюветках.

## Результаты и обсуждение

Влияние оптического излучения синей ( $\lambda = 463$  нм) и зеленой ( $\lambda = 517$  нм) областей спектра плотностью мощности  $I \approx 12$  мВт/см<sup>2</sup>, в энергетической дозе  $D = 14.4$  Дж/см<sup>2</sup> на выход ионов калия и гемоглобина из эритроцитов при различных условиях облучения (в отсутствие билирубина: no Br; при сенсibilизации билирубином: Br; в присутствии тушителя синглетного кислорода азид натрия: Br + NaN<sub>3</sub>) и анализа (через 40 мин или 18 часов после прекращения облучения) отражают данные, представленные на рисунке.

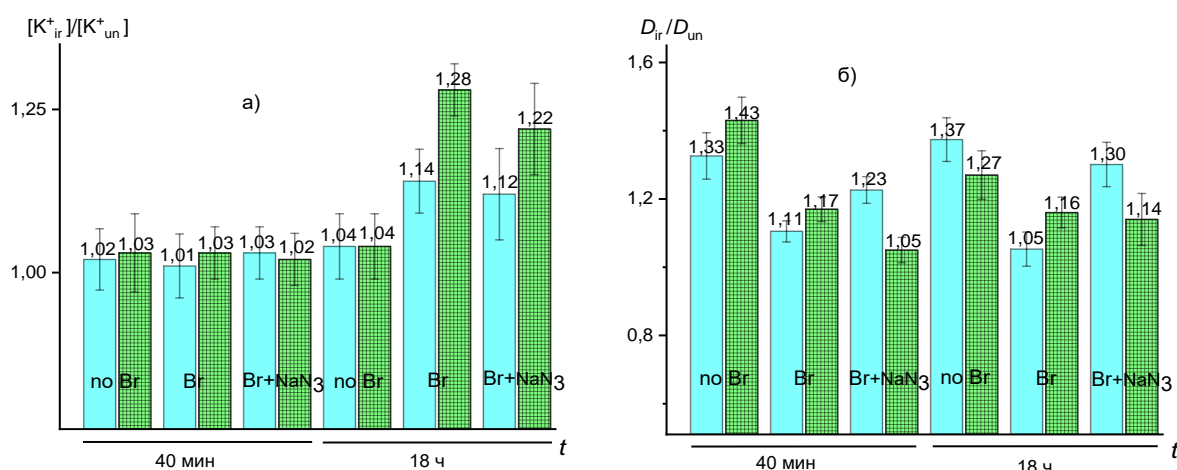


Рис. – Влияние оптического излучения синей и зеленой областей спектра на выход ионов калия (а) и гемоглобина (б) из эритроцитов при различных условиях облучения.

Из представленных данных следует, что воздействие излучения светодиодных источников синей или зеленой областей спектра в энергетической дозе  $D = 14.4$  Дж/см<sup>2</sup> на суспензию эритроцитов человека без добавления билирубина практически не влияет

на проницаемость клеточных мембран для ионов калия. Фотобиологический эффект, оцениваемый по данному тесту, практически отсутствует (превышение над контролем составляет 2–4 %) при его анализе как через 40 мин, так и через 18 ч после прекращения облучения. Следовательно, можно констатировать, что никакие эндогенные соединения не сенсибилизируют молекул, контролирующих выход ионов калия из эритроцитов (например, фермента Na/K-АТФаза, обеспечивающего асимметричное распределение ионов натрия и калия по обе стороны мембраны эритроцитов).

Иная ситуация реализуется при анализе выхода молекул гемоглобина из эритроцитов при воздействии излучения тех же параметров. Согласно полученным данным, облучение суспензии эритроцитов без добавок билирубина ускоряет выход гемоглобина в среднем на 27–43 % относительно соответствующих необлученных суспензий. Причем достоверное превышение оптической плотности супернатанта из облученных образцов над контрольным вариантом наблюдается как при оценке концентраций гемоглобина через 40 мин, так и через 18 часов после прекращения облучения. Характерно, что через 40 мин после прекращения облучения более выраженный эффект наблюдается при воздействии излучения зеленого диапазона:  $D_{ir}/D_{un} = 1.43$ , в то время как после облучения синим светом  $D_{ir}/D_{un} = 1.33$ . Однако, через 18 ч после прекращения облучения и темнового хранения суспензий эритроцитов соответствующие показатели составляют  $D_{ir}/D_{un} = 1.37$  для синего света и 1.27 для зеленого. То есть, величина эффекта при действии синего света на вторые сутки практически сохраняется, а от зеленого уменьшается на ~15%.

Имеются основания полагать, что повреждение мембран эритроцитов при их облучении светом сине-зеленой области спектра в отсутствие экзогенного билирубина обусловлено фотохимическими реакциями, сенсибилизированными эндогенными соединениями. На роль таких эндогенных фотосенсибилизаторов, поглощающих излучение видимой области спектра, и генерирующих с высокой эффективностью активные формы кислорода (АФК), прежде всего претендуют порфирины (протопорфирин IX и цинк-протопорфирин) и, в меньшей степени, флавиновые соединения (рибофлавин, флавиномононуклеотид и флавинадениндинуклеотид). Участие эндогенных флавиновых и порфириновых фотосенсибилизаторов в реализации регуляторного и летального действия оптического излучения видимой области спектра ранее было установлено ранее в нашей лаборатории в отношении микробных клеток и сперматозоидов [1–3]. В настоящее время присутствие порфириновых и флавиновых фотосенсибилизаторов в эритроцитах человека также не вызывает сомнения.

Выполненные исследования показали, что добавление в суспензию эритроцитов билирубина в концентрации 171 мкМ (предполагающей проведение фототерапии у детей с синдромом гипербилирубинемии) приводит к структурным изменениям эритроцитарной мембраны, что подтверждается интенсификацией выхода гемоглобина в темновых условиях (без облучения суспензии). Однако, вопреки ожиданиям, светоиндуцированный гемолиз в присутствии билирубина в указанной концентрации, не только не увеличивается, но и несколько снижается относительно клеток, не содержащих билирубина. Следовательно, в этом случае билирубин выступает в качестве антиоксиданта, снижая отток гемоглобина из эритроцитов, инициируемый фотохимическими реакциями в мембране за счет возбуждения эндогенных порфириновых и флавиновых фотосенсибилизаторов. При этом следует отметить, что способность билирубина тушить синглетный кислород хорошо известна.

Характерно, что сенсибилизированный билирубином отток ионов калия более выражен при воздействии излучения зеленой области спектра, несмотря на более сильное поглощение света синей области билирубином, локализованным в эритроцитах. Причиной аномальной зависимости светоиндуцированного выхода ионов калия из

эритроцитов от длины волны воздействующего излучения может быть участие фотоизомеров билирубина в процессах сенсibilизации, квантовый выход которых зависит от длины волны возбуждающего излучения. Другой причиной увеличения выхода ионов калия при переходе от излучения синей к излучению зеленой области спектра может быть гетерогенный характер микроокружения молекул билирубина в мембране эритроцитов. Вследствие этого излучение различных длин волн может возбуждать билирубин, локализованный в различных участках клеточной мембраны, и инициировать отличающиеся деструктивные процессы в мембране.

Исследования показали, что фотохимические деструктивные процессы в мембране эритроцитов, инициируемые за счет сенсibilизирующего действия билирубина и его фотоизомеров, протекают с частичным участием синглетного кислорода. Это подтверждается снижением выхода ионов калия при внесении в суспензию перед облучением тушителя синглетного кислорода азида натрия.

### **Заключение**

Возможность фотоповреждения мембран эритроцитов при проведении фототерапии желтухи новорожденных детей, а также при осуществлении ВЛОК-терапии следует учитывать при разработке новых фототерапевтических технологий.

### **Литература**

1. Plavskii V. Y., Mikulich A. V., Tretyakova A. I., Leusenka I. A., Plavskaya L. G., Kazyuchits O. A., Dobysh I. I., Krasnenkova T. P. Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. Vol. 183, P. 172–183
2. Plavskii V., Mikulich A., Barulin N., Ananich T., Plavskaya L., Tretyakova A., Leusenka I. Comparative effect of low-intensity laser radiation in green and red spectral regions on functional characteristics of sturgeon sperm. *Photochem Photobiol*. 2020. Vol. 96, No 6, P. 1294-1313.
3. Plavskii V. Y., Barulin N. V., Mikulich A. V., Tretyakova A. I., Ananich T. S., Plavskaya L. G., Leusenka I. A., Sobchuk A. N., Sysov V. A., Dudinova O. N., Vodchits A. I., Khodasevich I. A., Orlovich V. A. Effect of continuous wave, quasi-continuous wave and pulsed laser radiation on functional characteristics of fish spermatozoa. *J Photochem Photobiol B: Biology*. 2021. Vol. 216, 112112.

## **Influence of blue-green radiation on human erythrocytes in vitro**

J.V. Kruchenok, O.N. Dudinova, V.Yu. Plavskii

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

It was shown that exposure of erythrocyte suspension to light from LED sources of blue ( $\lambda = 463$  nm) and green ( $\lambda = 517$  nm) spectral regions leads to damage to cell membranes, controlled by the release of hemoglobin molecules. The main contribution to damage is made by photochemical reactions sensitized by endogenous porphyrins, which are present in cells at low concentrations. Unlike light-induced hemolysis, the outflow of potassium ions from erythrocytes (regulated by the enzyme  $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ ) changes insignificantly as a result of exposure to light. It was found that bilirubin in the concentration indicated for phototherapy in newborns with hyperbilirubinemia (jaundice) syndrome is able to reduce the efficiency of photohemolysis (acting as an antioxidant) and intensify the light-induced outflow of potassium ions from erythrocytes (acting as a photosensitizer).

**Keywords:** erythrocytes, LEDs, photohemolysis, endogenous porphyrins, bilirubin.