

О механизме фотоповреждения клеток, сенсibilизированных куркумином

О. Н. Дудинова, Л. Г. Плавская, А. И. Третьякова, А. В. Микулич,
Т. С. Ананич, Н. Д. Прокопенко, Р. К. Нагорный, Ю. В. Крученок,
А. Н. Собчук, С. В. Якимчук, И. А. Леусенко, В. М. Катаркевич,
В. Ю. Плавский

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

Впервые показано, что при контроле сенсibilизированного куркумином фотоповреждения раковых клеток HeLa тип активных форм кислорода (АФК), определяющих механизм фотохимических процессов, зависит от длительности темнового промежутка после прекращения светового воздействия. После светоиндуцированной генерации синглетного кислорода запускается волна массивной вторичной продукции АФК, прежде всего перекиси водорода, которая повреждает клетки в течение длительного времени после окончания их облучения.

Ключевые слова: куркумин; раковые клетки; фотосенсибилизатор; фотодинамическая терапия; хемилюминесценция; синглетный кислород; перекись водорода.

On the mechanism of photodamage of cells sensitized by curcumin

O. N. Dudinova, L. G. Plavskaya, A. I. Tretyakova, A.V. Mikulich, T. S. Ananich,
N. D. Prokopenko, R. K. Nahorny, J. V. Kruchenok, A. N. Sobchuk, S. V. Yakimchuk,
I. A. Leusenko, V. M. Katarkevich, V. Yu. Plavskii

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

It has been shown for the first time that in the control of curcumin-sensitized photodamage of HeLa cancer cells, the type of reactive oxygen species (ROS) that determine the mechanism of photochemical processes depends on the duration of the dark interval after cessation of light exposure. After the light-induced generation of singlet oxygen, a wave of massive secondary ROS production is triggered, primarily hydrogen peroxide, which damages cells for a long time after the end of their irradiation.

Keywords: curcumin; cancer cells; photosensitizer; photodynamic therapy; chemiluminescence; singlet oxygen; hydrogen peroxide.

Введение

Несмотря на большое количество публикаций об использовании куркумина в качестве фотосенсибилизатора для антимикробной фотодинамической терапии и сенсibilизированного подавления роста раковых клеток, подробный механизм химических реакций, лежащих в основе этой технологии, остается неясным [1]. В этой работе мы впервые показываем, что после прекращения воздействия света на раковые клетки, сенсibilизированные куркумином, химические темновые процессы в клетках продолжают протекать, и вклад различных типов активных форм кислорода (АФК) в эти реакции зависит от продолжительности темного периода.

1. Материалы и методы исследований

Реагенты. В работе использовали куркумин аналитической чистоты производства Sigma-Aldrich, США.

Культура клеток. В качестве объектов исследования были выбраны клетки эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa. Метаболическую активность клеток характеризовали с помощью колориметрического МТТ-теста [2].

Процедура облучения клеток. Монослой клеток облучали через дно чашек Петри излучением светодиодов с длинами волн $\lambda_{\max} = 405$ нм и $\lambda_{\max} = 445$ нм или излучением полупроводникового лазера с теми же длинами волн при дозе энергии $D = 0,9\text{--}15$ Дж/см².

Участие АФК в фотохимических процессах. Для определения возможного участия активных форм кислорода в фотодинамическом действии оптического излучения к культуре клеток за 30 мин до облучения добавляли 10 мМ азида натрия (туши-тель синглетного кислорода) или 10 мМ пирувата натрия (перехватчик переки-си водорода). Соответствующие добавки были также добавлены к контрольным (необлученным) культурам клеток. Участие АФК в повреждении клеток контролировалось как непосредственно после их облучения (оценивая величину фотобиологического эффекта методом хемилюминесцентного анализа), так и через 21 ч после завершения процедуры светового воздействия (контролируя величину фотобиологического эффекта по изменению метаболической активности клеток – МТТ-анализ).

Хемилюминесцентный анализ. Для определения вклада АФК в фотобиологические эффекты использовали метод не активированной хемилюминесценции.

2. Темновое и световоиндуцированное изменение метаболической активности (выживаемости) клеток в присутствии куркумина

Исследования показали, что инкубация клеток HeLa с куркумином в темновых условиях способна приводить к инактивации клеток, что подтверждается данными рис. 1, кривая 1. Однако ингибирующий эффект значительно увеличивается (кривая 2) после воздействия ($t = 5$ мин) на монослой клеток, инкубированные с куркумином, оптического излучения ($\lambda_{\max} = 445$ нм, плотность мощности $I = 5$ мВт/см²), соответствующего спектру поглощения препарата. Отметим, что в данном эксперименте время инкубации клеток с куркумином до облучения составляло 12 ч, а анализ метаболической активности клеток осуществлялся через 12 ч после их облучения. При этом в указанных условиях эксперимента воздействие света в отсутствие куркумина приводило к снижению метаболической активности не более чем на 8 %. Согласно результатам [2], наличие фотобиологического эффекта на клетки в отсутствие куркумина обусловлено фотовозбуждением эндогенных фотосенсибилизаторов (порфиринов и флавинов), локализованных в клетках. Повреждающее действие света на клетки, сенсibilизированные куркумином, подтверждается также данными рис. 2. Характерно, что ингибирующий эффект светового воздействия растет с увеличением темнового промежутка после прекращения облучения клеток.

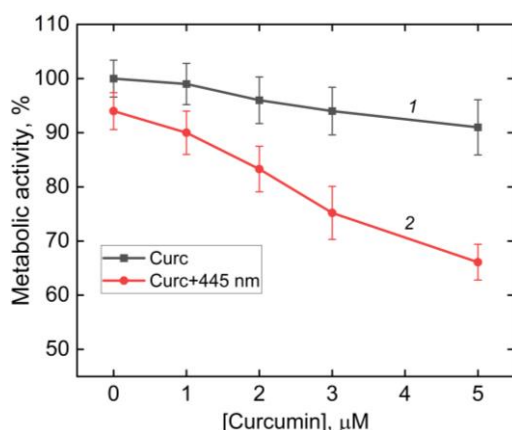


Рис. 1. Изменение метаболической активности клеток HeLa при взаимодействии с куркумином различных концентраций: в отсутствие света (1) и после воздействия лазерного излучения $\lambda = 445$ нм, плотность мощности $I = 25$ мВт/см², $t = 5$ мин (2)

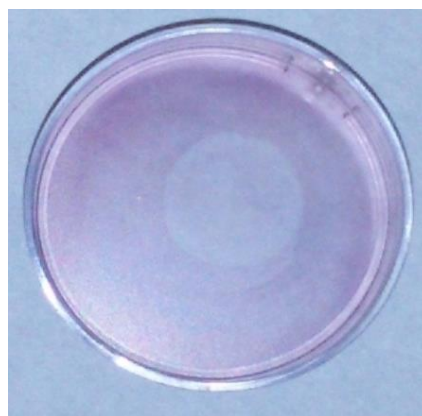


Рис. 2. Фотодинамическое повреждение монослоя клеток HeLa, инкубированных с куркумином, при воздействии на центральную зону излучения светодиодного источника с $\lambda_{\text{max}} = 405$ нм, интенсивностью излучения $I = 25$ мВт/см² и $t = 5$ мин.

Исследования показали, что величина фотобиологического эффекта, инициируемого воздействием на клетки, сенсibilизированные куркумином, излучения синей области спектра, существенно зависит от его концентрации (рис. 3). Так, при концентрации куркумина, вносимого к монослоям клеток, равной 1, 2, 5 мкМ, снижение метаболической активности клеток в результате фотодинамического воздействия (через 21 ч после облучения клеток) составляет соответственно: 39 %, 48 % и 82 % (диаграммы 4, 6, 8).

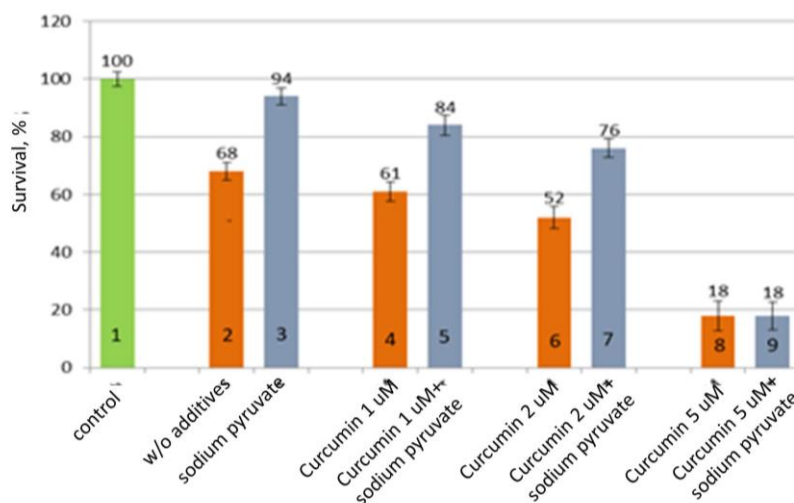


Рис. 3. Выживаемость клеток HeLa (в процентах от контроля) через 21 час после облучения светодиодным источником с $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм, интенсивностью излучения $I = 50$ мВт/см² при $t = 300$ с: 1 – контроль без облучения; 2–9 – экспериментальные группы (2 – без добавок, 3 – в присутствии 10 мМ пирувата, 4, 6, 8 – в присутствии 1, 2, 5 мкМ куркумина, 5, 7, 9 – в присутствии куркумина и пирувата)

То есть, в диапазоне концентраций 1–5 мкМ величина фотобиологического эффекта растет с увеличением концентрации сенсibilизатора. Характерно, что после добавления пирувата натрия (перехватчика перекиси водорода) перед облучением монослоев эффект фотодеструкции клеток значительно снижается (диаграммы 5, 7). Защитное действие пирувата является доказательством того, что в данном процессе определяющую роль играет пероксид водорода, образование которого инициировано генерацией синглетного кислорода фотосенсибилизатором при его возбуждении. Вместе с тем следует отметить, что при высокой степени фотоповреждения клеток (снижении их выживаемости на 82 %, диаграмма 8), внесение пирувата натрия не обеспечивает повышения выживаемости клеток (диаграмма 9). Иными словами, при высокой концентрации фотосенсибилизатора перехватчик перекиси водорода не способен защитить клетки от повреждения, инициированного сенсibilизирующим действием куркумина.

3. Использование хемилюминесценции для выяснения вклада АФК в фотоповреждение клеток, сенсibilизированных куркумином

Еще одним методом контроля участия АФК в фотохимических процессах в клетках, сенсibilизированных куркумином, служила хемилюминесценция. Кинетика регистрируемого сигнала спонтанной хемилюминесценции необлученных клеток, а также кинетические кривые хемилюминесценции, индуцированной воздействием на суспензию клеток HeLa концентрацией $2 \cdot 10^6$ мл⁻¹ в присутствии 5 мкМ куркумина в течение $t = 3$ мин лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 405$ нм, плотностью мощности $I = 5$ мВт/см² и $I = 50$ мВт/см² представлены на рис. 4. При этом указанные кривые регистрировали через 24 с после прекращения облучения суспензии клеток.

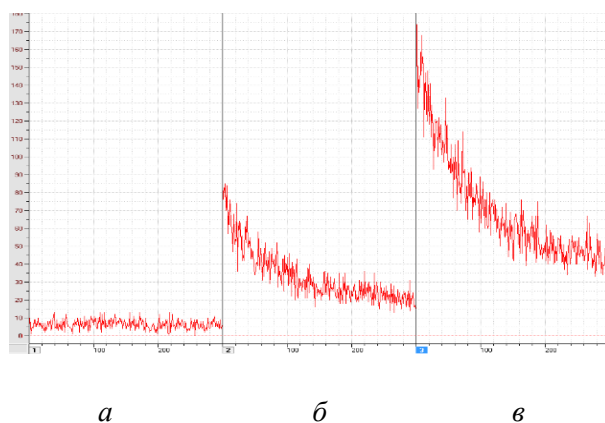


Рис. 4. Хемилюминесценция суспензии клеток HeLa с концентрацией $2 \cdot 10^6$ мл⁻¹ в присутствии 5 мкМ куркумина до и после воздействия ($t = 3$ мин) лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 405$ нм:

a – до облучения; *б* – после воздействия лазерного излучения с интенсивностью облучения $I = 5$ мВт/см²; *в* – после воздействия лазерного излучения с интенсивностью $I = 50$ мВт/см²

Из рисунка видны существенные различия кинетических кривых необлученных (вариант *a*) и облученных (варианты *б* и *в*) суспензий клеток, а также зависимость хемилюминесценции от интенсивности воздействующего излучения. Установлено также, что фотоповреждение клеток, сенсibilизированных куркумином,

протекает с определяющим участием синглетного кислорода, в то время как перекись водорода не играет существенной роли в данном процессе. Данный вывод следует из результатов, представленных на рис. 5, который показывает ход кинетики затухания хемилюминесценции суспензии клеток, сенсibilизированных куркумином, в отсутствие тушителей активных форм кислорода (вариант *а*), а также при их облучении в присутствии тушителя синглетного кислорода азиды натрия (вариант *б*) и перехватчика перекиси водорода пирувата натрия (вариант *в*).

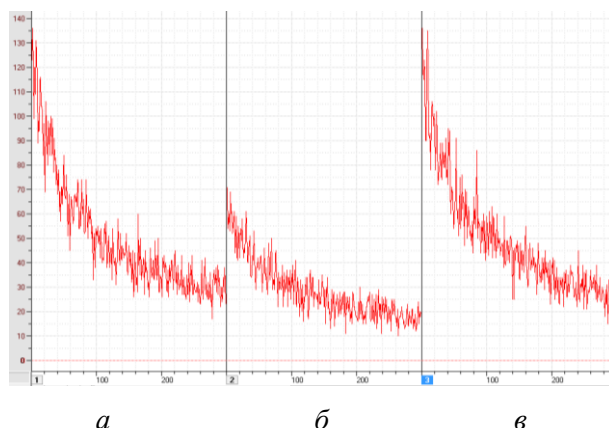


Рис. 5. Хемилюминесценция клеточной суспензии HeLa с концентрацией $2 \cdot 10^6$ мл^{-1} в присутствии 5 $\mu\text{М}$ куркумина (*а*), куркумина и 10 мМ азиды натрия (*б*), куркумина и 10 мМ пирувата натрия (*в*) непосредственно после воздействия в течение $t = 3$ мин лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 405$ нм, интенсивность излучения $I = 5$ мВт/см^2

Заключение

Представленные данные свидетельствуют об участии активных форм кислорода в механизме фотоповреждения раковых клеток, сенсibilизированных куркумином. При этом, если непосредственно после прекращения воздействия света основным интермедиатом выступает синглетный кислород, то спустя 21 ч после облучения – перекись водорода. Сделан вывод, что после прекращения облучения клеток запускается волна массивной вторичной продукции АФК, и, прежде всего, перекиси водорода, которая участвует в повреждении клеток спустя длительное время после процедуры их облучения.

Благодарности

Авторы признательны Белорусскому республиканскому фонду фундаментальных исследований за финансирование исследований в рамках проекта № Ф25УЗБ-132

Библиографические ссылки

1. The bright side of curcumin: a narrative review of its therapeutic potential in cancer management / A. Amaroli [et al.] // *Cancers*. 2024. Vol. 16, iss. 14. P. 2580.
2. Spectral dependence of inhibitory effect of blue light on cancer cells and efficacy of light-induced intracellular generation of reactive oxygen species in vitro / V. Y. Plavskii [et al.] // *J. Biomed. Res. Environ. Sci.* 2024. Vol. 5, iss. 11. P. 1531–1555.