

Об оптимальной длине волны излучения для сенсibilизированного куркумином фотоповреждения клеток

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

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

На основании анализа спектра возбуждения флуоресценции куркумина, локализованного в раковых клетках и спектральной зависимости светосуммы светоиндуцированной хемилюминесценции суспензии клеток, сенсibilизированных куркумином, определена оптимальная длина волны для их фотоповреждения.

Ключевые слова: куркумин; фотосенсibilизатор; фотодинамическая терапия; флуоресценция, спектр возбуждения флуоресценции, хемилюминесценция, раковые клетки.

On the optimal radiation wavelength for curcumin-sensitized photodamage of cells

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

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

Based on the analysis of the spectrum of excitation of curcumin fluorescence localized in cancer cells and the spectral dependence of the light sum of the light-induced chemiluminescence of a suspension of cells sensitized with curcumin, the optimal wavelength for their photodamage was determined.

Keywords: curcumin; photosensitizer; photodynamic therapy; fluorescence, fluorescence excitation spectrum, chemiluminescence, cancer cells.

Введение

Хорошо известно, что противоопухолевое, фунгицидное и противомикробное действие куркумина, натурального растительного препарата группы полифенолов из корня *Curcuma longa*, может быть значительно усилено за счет его сенсibilизирующих свойств [1–3]. Считается [3, 4], что главную роль в механизме сенсibilизированного повреждения патогенов играют активные формы кислорода (и, прежде всего, синглетный кислород), генерируемые при фотовозбуждении куркумина. Однако длина волны излучения, оптимальная для ингибирования чувствительных к куркумину клеток, не определена. Это связано с сильной зависимостью абсорбционных свойств куркумина от микроокружения (типа растворителя). Считается [1–3], что причина такой зависимости связана с существованием в растворе кетоенольных таутомеров куркумина. Как правило, в неполярных растворителях присутствуют обе таутомерные формы, тогда как в полярных растворителях

преобладает енольный таутомер. Причем, связывание с белками и другими молекулами способно приводить к изменению положения кетоенольного равновесия. Все это свидетельствует о неопределенности оптимальной длины волны излучения для инициирования гибели патогенных клеток, сенсibilизированных куркумином.

Целью данной работы является определение длины волны излучения, оптимальной для фотоповреждения раковых клеток.

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.

Флуоресцентная спектроскопия. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции куркумина, связанного с клетками, регистрировали в суспензии клеток в физрастворе после удаления несвязанного препарата, локализованного в надосадочной жидкости после процедуры центрифугирования суспензии клеток. Время инкубации клеток с куркумином в концентрации 6 мкМ до процедуры центрифугирования 2 ч. Измерения спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Inc., France).

Конфокальная флуоресцентная микроскопия. Для исследования локализации куркумина в клетках использовался лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 510 NLO.

Хемилюминесцентный анализ. Оптимальную длину волны для сенсibilизированного куркумином фотоповреждения раковых клеток определяли, исследуя зависимость хемилюминесценции от длины волны лазерного излучения при его постоянной интенсивности и времени воздействия. Облучение суспензии клеток осуществляли с помощью твердотельного Nd:YAG I-лазера (Модель LQ629, Солар ЛС, Беларусь) с оптическим параметрическим генератором (ОРО) и генератором второй гармоники для ОРО, генерирующего наносекундное импульсное излучение, плавно перестраиваемое в УФ, видимой и ближней ИК-областях спектра. Измерения хемилюминесценции проводились сразу после прекращения облучения.

2. Использование метода флуоресцентного анализа для определения оптимальной длины волны излучения

С помощью конфокальной микроскопии мы показали, что куркумин способен проникать через клеточные мембраны клеток HeLa. Значительная часть препарата локализована вблизи клеточной мембраны, в то время как часть флуоресцентного куркумина сосредоточена в цитоплазме и внутриклеточных компартментах (рис. 1).

Полагая, что спектры возбуждения флуоресценции красителя должны соответствовать спектрам его поглощения, мы изучили спектры возбуждения флуоресценции куркумина, локализованного в клетках.

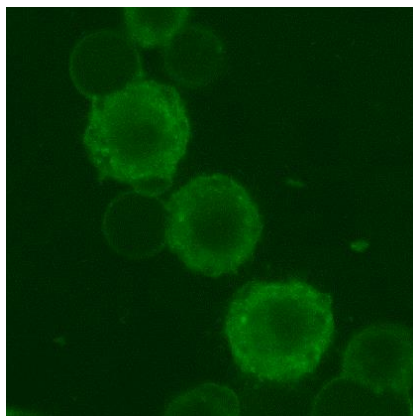


Рис. 1. Флуоресценция живых клеток HeLa после 2-часовой инкубации с куркумином при возбуждении лазерным излучением $\lambda = 457,9$ нм

Обнаружено, что при возбуждении излучением $\lambda_{\text{ex}} = 425$ нм флуоресценция куркумина, локализованного в клетках, характеризуется широкой полосой в области 460–700 нм с максимумом при $\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}} = 497$ нм (рис. 2, кривая 2). В спектре возбуждения флуоресценции куркумина, связанного с клетками, регистрируется полоса с максимумом при $\lambda_{\text{max}} = 424$ нм и менее интенсивным (на 15 %) максимумом в области $\lambda_{\text{max}} = 445$ нм (кривая 4).

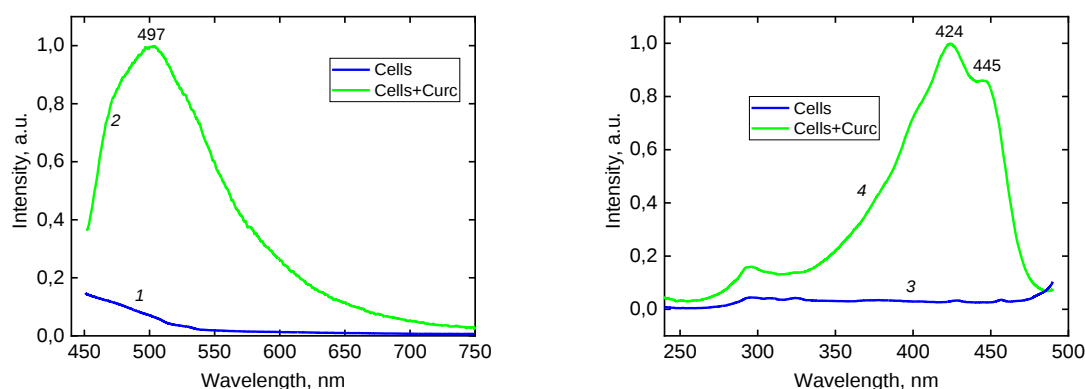


Рис. 2. Спектры флуоресценции (1, 2) и возбуждения флуоресценции (3, 4) клеток HeLa в отсутствие куркумина (1, 3) и после его инкубации с клетками в течение 2 ч (2, 4) при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 425$ нм (1, 2), длине волны регистрации $\lambda_{\text{em}} = 500$ нм (3, 4)

Дополнительно выполненные исследования спектрально-флуоресцентных характеристик комплексов куркумина с белками, показали (рис. 3), что для куркумина в комплексе с альбумином быка характерно наличие максимума в спектре флуоресценции при $\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}} = 507 \pm 2$ нм (кривая 1), а в спектре возбуждения – при $\lambda_{\text{max}} = 426$ –429 нм (в зависимости от длины волны регистрации флуоресценции), кривые 2 и 3. Положение максимумов в спектре флуоресценции и ее возбуждения зависит также от типа белка, отличаясь для комплексов куркумина с альбумином человека.

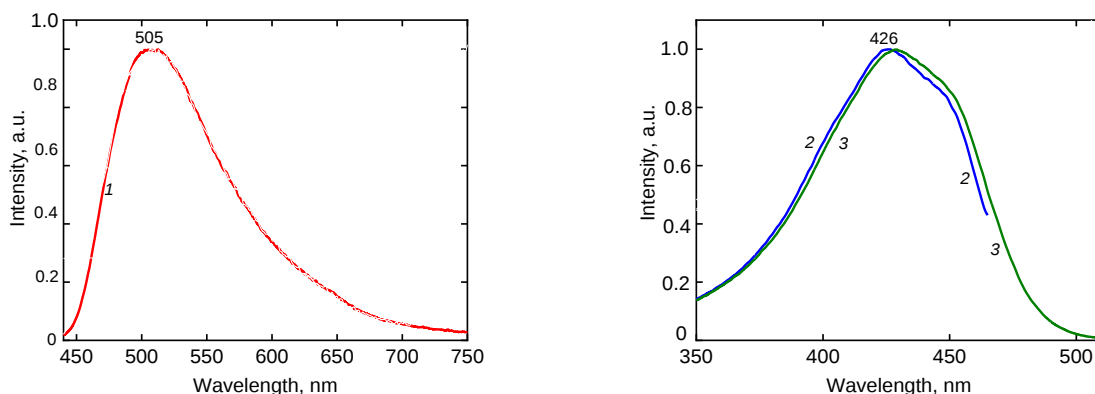


Рис. 3. Спектры флуоресценции (1) и возбуждения флуоресценции (2, 3) куркумина, связанного с сывороточным альбумином быка при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 425 \text{ nm}$ (1), длине волны регистрации $\lambda_{\text{em}} = 480$ (2) и 525 nm (3)

При этом для комплексов альбумина с белками в спектре возбуждения флуоресценции проявляется выраженное «плечо» в области $\lambda = 450 \text{ nm}$, в отличие от дополнительного максимума в области $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$, характерного для спектра возбуждения флуоресценции куркумина, локализованного в клетках. Известно, что куркумин, будучи гидрофобным соединением, связывается также с липосомами [5]. При этом для комплекса куркумина с фосфатидилхолиновыми липосомами максимум в спектре поглощения расположен при $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$, а в спектре флуоресценции – при $\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}} = 498 \text{ nm}$.

Совокупность представленных данных позволяет предположить, что куркумин, локализованный в клетках, характеризуется гетерогенным окружением: он может быть встроен как в белковые макромолекулы (мембран-связанные белки), так и в липидные структуры клеток. Поскольку гетерогенные центры связывания пигментов, характеризуются отличающимися спектральными параметрами и квантовыми выходами флуоресценции, то суммарный спектр возбуждения флуоресценции не в полной мере соответствует спектру поглощения пигмента в клетках.

3. Использование хемилюминесцентного метода для определения оптимальной длины волны излучения для фотоповреждения клеток

Для определения оптимальной длины волны излучения для фотоповреждения раковых клеток, сенсibilизированных куркумином, нами исследовалась зависимость светосуммы хемилюминесценции от длины волны лазерного излучения при его постоянной интенсивности (средняя плотность мощности $I = 15 \text{ мВт/см}^2$) и времени воздействия ($t = 3 \text{ мин}$). Полученные данные представлены на рис. 4. Видно, что максимальное повреждающее действие на раковые клетки оказывает излучение в спектральном диапазоне $425\text{--}440 \text{ nm}$. При переходе к длине волны 450 nm повреждающее действие снижается на 5 %, а к длине волны 465 nm – на 32 %. То есть, согласно данным хемилюминесцентного анализа, излучение в длинноволновой части синего диапазона длин волн обладает выраженным фотодинамическим действием. Эти данные несколько отличаются от результатов, основанных на регистрации спектров возбуждения флуоресценции куркумина, локализованного в клетках (см. рис. 2, кривая 4).

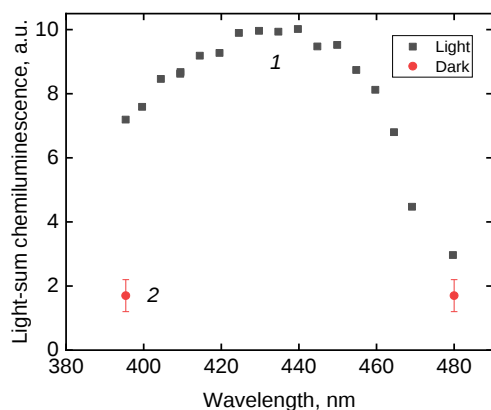


Рис. 4. Зависимость светосуммы хемилюминесценции суспензии клеток HeLa, сенсibilизированных куркумином, от длины волны воздействующего лазерного излучения при его постоянной интенсивности (средняя плотность мощности $I = 15 \text{ мВт/см}^2$) и времени воздействия ($t = 3 \text{ мин}$): 1 – для облученных суспензий клеток; 2 – для контрольных необлученных суспензий.

Заключение

Зависимость сигнала светоиндуцированной хемилюминесценции суспензии раковых клеток, сенсibilизированных куркумином, от длины волны воздействующего лазерного излучения более адекватно отражает его повреждающее действие, чем зависимость интенсивности флуоресценции куркумина от длины волны возбуждения. Различие в полученных результатах обусловлены гетерогенностью окружения куркумина в клетках (его связыванием как с белковыми макромолекулами, так и липидными структурами клеток), вследствие чего спектр возбуждения флуоресценции куркумина в клетках не соответствует его спектру поглощения.

Благодарности

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

Библиографические ссылки

1. Ghosh M, Sarkar N. Exploring the world of curcumin: photophysics, photochemistry, and applications in nanoscience and biology // *Chembiochem*. 2024. Vol. 25, iss.23. e202400335.
2. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy / L. D. Dias [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 2020. Vol. 45. P. 100384.
3. Priyadarsini K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 2009. Vol. 10, iss. 2. P. 81–95.
4. Spectral and photochemical properties of curcumin / C. F. Chignell [et al.] // *Photochem. Photobiol.* 1994. Vol. 59, iss. 3. P. 295–302.
5. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells / A. Kunwar [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1780, iss. 4. P. 673–679.