

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ



**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**

¹ ИНСТИТУТ ФИЗИКИ НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

² Институт материаловедения, ВАНТ, г. Ханой, Вьетнам

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

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

Введение

В настоящее время для лечения онкологических заболеваний и заболеваний неопухолевого генеза, а также для преодоления антимикробной резистентности, активно применяется фотодинамическая терапия (ФДТ) – биофотонная технология, основанная на сочетанном действии фотоактивного соединения (фотосенсибилизатора) и оптического излучения. Эффективность метода зависит от типа используемого фотосенсибилизатора. Несмотря на успехи, достигнутые в последнее время с использованием различного рода соединений при ФДТ в качестве фотосенсибилизаторов, сложность их синтеза, стоимость и низкая биодоступность являются сдерживающими факторами для их широкого внедрения. На роль натуральных фотосенсибилизаторов, лишенных указанных недостатков, могут претендовать экстракты лекарственных растений.

Цель работы

Исследовать фотофизические и фотосенсибилизирующие свойства экстрактов лекарственных растений, потенциально способных выступать в качестве фотодинамически активных соединений.

Материалы и методы

Объекты исследования

- ❑ 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

Фотофизические свойства экстрактов

- ❑ Абсорбционные исследования (спектрофотометр UV VIS PB 2201 (Солар, Республика Беларусь)).
- ❑ Флуоресцентные исследования (спектрофлуориметр CM 2203 (Солар, Республика Беларусь)). С целью исключения экранирования излучения при записи спектров флуоресценции оптическая плотность растворов (D) не превышала $D = 0,1-0,2$.

Эффективность генерации синглетного кислорода экстрактами

- ❑ Прямое измерение люминесценции синглетного кислорода в области $\lambda = 1270$ нм с использованием охлаждаемого жидким азотом ПЗС-детектора Symphony II спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Scientific, Франция).
- ❑ Возбуждение фотосенсибилизированной 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.
- ❑ Квантовые выходы генерации синглетного кислорода экстрактами лекарственных растений определялись относительным методом. В качестве эталонного соединения использовали раствор метиленового синего в этаноле, для которого квантовый выход генерации синглетного кислорода $\gamma = 0,52$. В качестве растворителя использовали 96 % этанол.

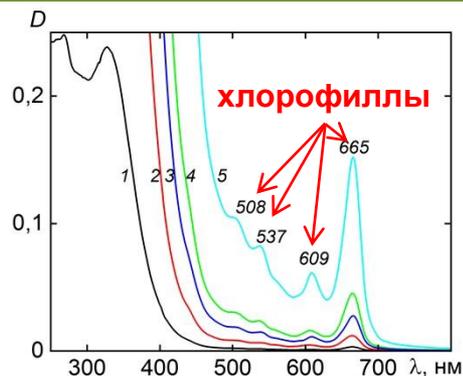
Материалы и методы II

Фотодинамическое действие экстрактов

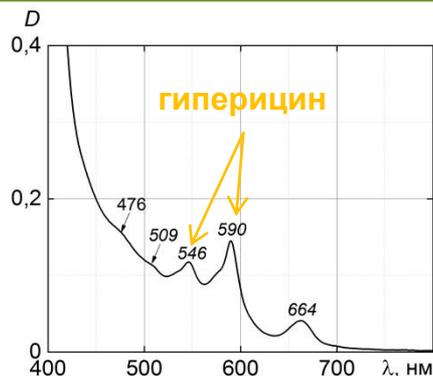
- ❑ **Объект**: Культура клеток почечной ткани обезьяны BGM
- ❑ **Посевная доза**: 10^5 клеток/мл
- ❑ **Условия культивирования**: Клетки выращивали в одноразовых стерильных чашках Петри на питательной среде Игла Дулбеко DME с 5% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C и 5% содержанием CO₂ в инкубаторе.
- ❑ **Инкубация**: Экстракты вносили непосредственно в чашки Петри с клетками. Время инкубации – 60 минут. Перед воздействием оптическим излучением питательную среду с экстрактами заменяли на свежую (без экстрактов) со всеми необходимыми для роста клеток ингредиентами.
- ❑ **Облучение**: В качестве источников излучения использовали светодиодный источник с длиной волны $\lambda = 660$ нм ($\Delta\lambda = 10$ нм), плотностью мощности – 10 мВт/см². Клеточный монослой в чашках Петри подвергался излучению через дно чашек.
- ❑ **Анализ**: Колориметрический МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенилтетразолиум бромид в кристаллы формазана, не растворимые в воде. Через 24 часа после воздействия в чашки Петри с клеточной культурой добавляли по 100 мкл раствора МТТ-реагента в воде (концентрация 5 мг/мл). Чашки инкубировали в течение 3 ч при 37 °С и 5%-ом содержании CO₂. После инкубации, в каждую чашку Петри добавляли 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Анализ проводили спектрофотометрически на длине волны $\lambda = 570$ нм, учитывая, что оптическая плотность на указанной длине волны пропорциональна количеству жизнеспособных клеток. Эффект характеризовали параметром $\eta = (D_0/D_k) \cdot 100$ %, где D_0 – и D_k – оптическая плотность раствора формазана из опытных и контрольных чашек Петри, соответственно.
- ❑ **Оборудование**: Инвертированный флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss AxioVert.A1 FL (Carl Zeiss, Германия) с цифровой CCD камерой AxioCam 506 Color; спектрофотометр UV VIS PB 2201 (Солар, Республика Беларусь)

Абсорбционные и флуоресцентные исследования экстрактов лекарственных растений

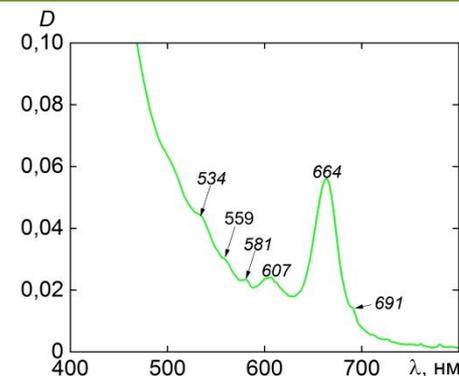
❖ Анализ спектров поглощения и флуоресценции экстрактов лекарственных растений показывает, что в их составе содержатся хлорофилловые и гиперциновые компоненты, способные оказывать фотосенсибилизирующее действие.



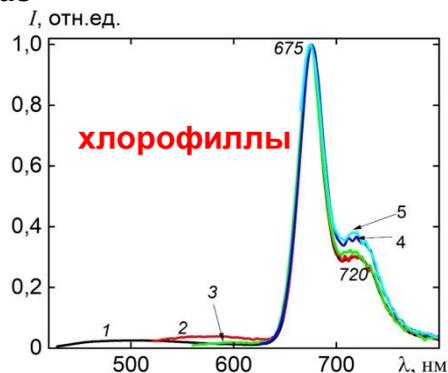
Спектры поглощения препарата «Ротатит», разбавленного 65% этанолом: 1- в 800 раз; 2 - в 200 раз; 3 - в 90 раз; 4 - в 65 раз; 5 - в 20 раз



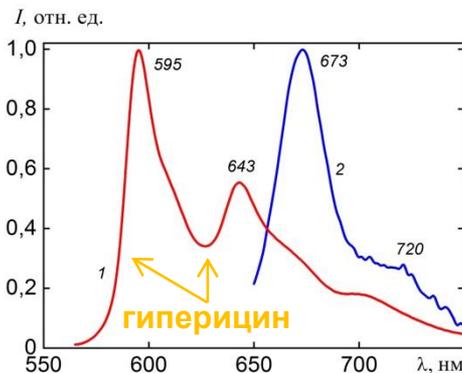
Спектр поглощения препарата на основе травы зверобоя продырявленного, разбавленного 65% этанолом в 49 раз



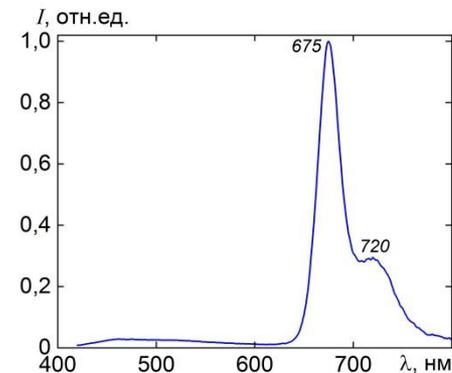
Спектр поглощения препарата из листьев эвкалипта прутовидного, разбавленного 64% этанолом в 49 раз



Спектры флуоресценции препарата «Ротатит»: 1 - $\lambda_{\text{возб}} = 408$ нм; 2 - $\lambda_{\text{возб}} = 502$ нм; 3 - $\lambda_{\text{возб}} = 540$ нм; 4 - $\lambda_{\text{возб}} = 608$ нм; 5 - $\lambda_{\text{возб}} = 645$ нм



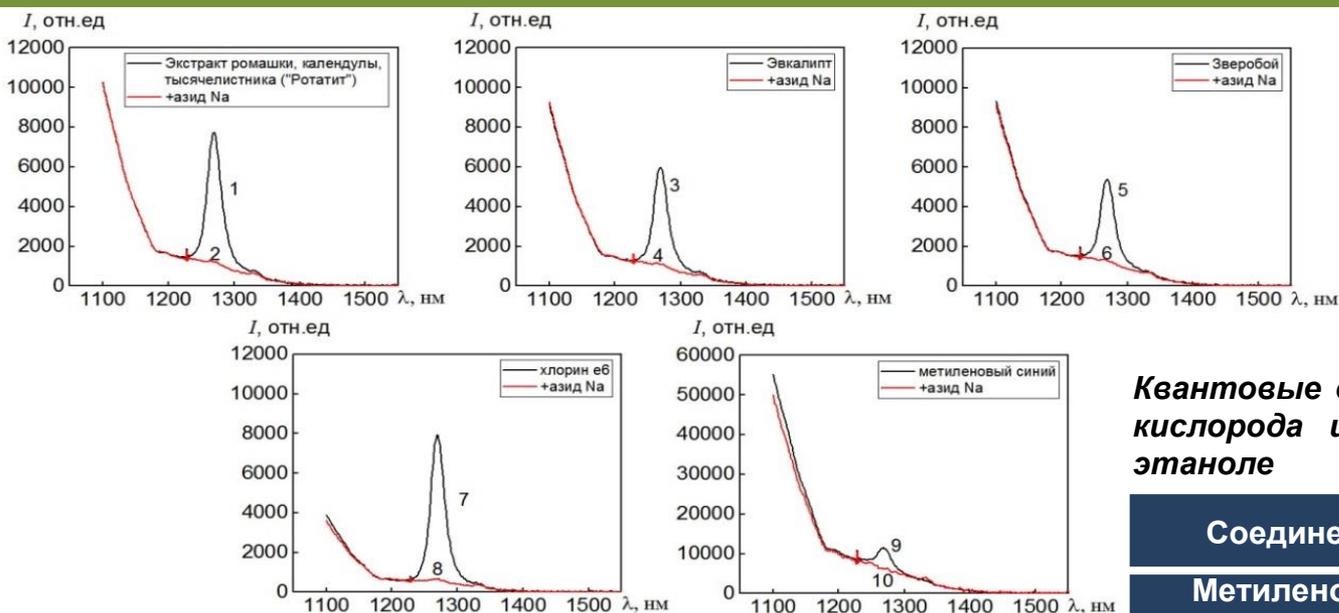
Спектры флуоресценции препарата на основе травы зверобоя продырявленного: 1- $\lambda_{\text{возб}} = 550$ нм; 2 - $\lambda_{\text{возб}} = 630$ нм



Спектр флуоресценции препарата из листьев эвкалипта прутовидного при $\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм

Эффективность генерации синглетного кислорода экстрактами лекарственных растений

- ❖ Экстракты лекарственных растений являются эффективными генераторами синглетного кислорода.
- ❖ Подтверждением способности экстрактов лекарственных растений к генерации $^1\text{O}_2$ является зарегистрированная люминесценция $^1\text{O}_2$ в области $\lambda = 1270$ нм при возбуждении оптическим излучением с длинами волн $\lambda = 590$ нм и $\lambda = 665$ нм, соответствующим максимумам поглощения содержащихся в этанольных экстрактах соединений гиперациновой и хлорофилловой природы. Добавление азида натрия (тушителя синглетного кислорода) приводит к снижению интенсивности люминесценции в области $\lambda = 1270$ нм.



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 е₆; 9, 10 – метиленовый синий (2, 4, 6, 8, 10 – с добавлением азида натрия (конечная концентрация в кювете – 10 мМ)

Квантовые выходы генерации синглетного кислорода исследуемыми соединениями в этаноле

Соединение	$\lambda = 665$ нм	$\lambda = 590$ нм
Метиленовый синий	0,52	0,52
Хлорин е ₆	0,71	-
Препарат «Ротатит»	0,64	-
Препарат на основе травы зверобоя продырявленного	0,40	0,16
Препарат из листьев эвкалипта прутовидного	0,48	-

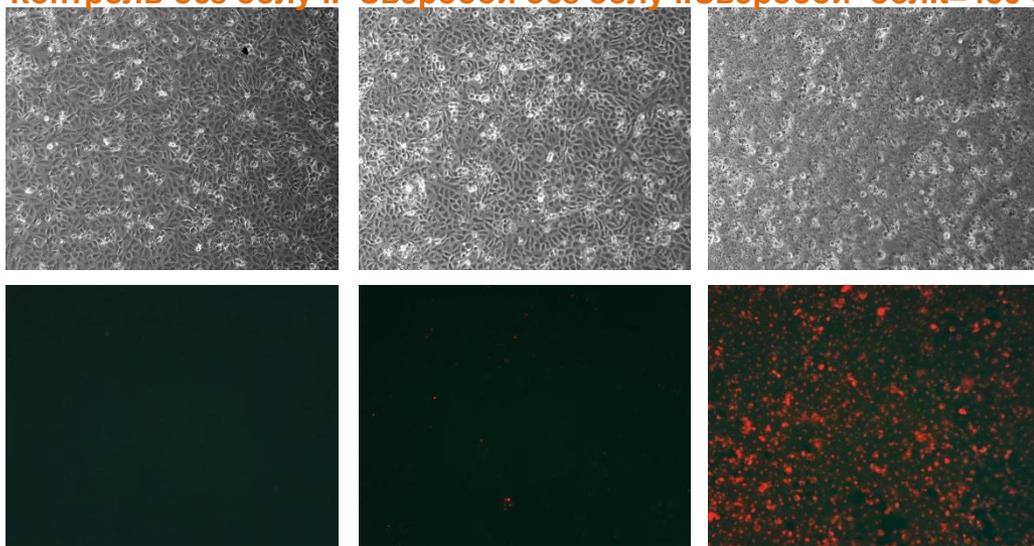
Фотодинамическая активность экстрактов лекарственных растений

❖ При воздействии оптическим излучением в полосу поглощения хлорофилловой компоненты на культуру клеток млекопитающих, сенсibilизированную экстрактами лекарственных растений, регистрируется выраженный фотодинамический эффект.

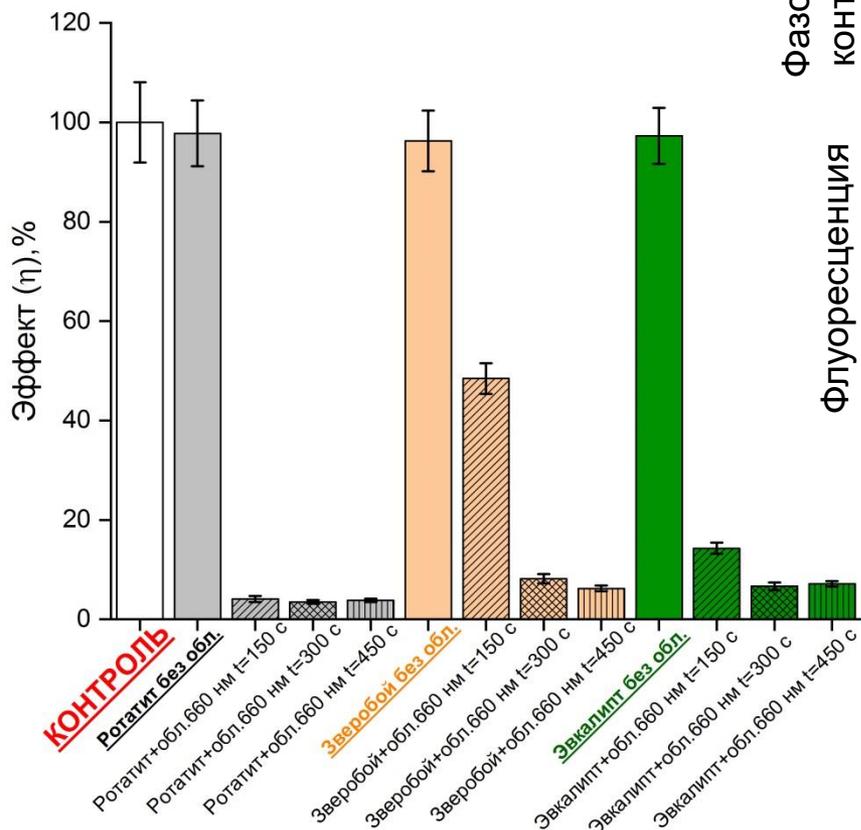
Фотодинамическое действие экстрактов лекарственных растений на культуру клеток почечной ткани обезьяны BGM при воздействии излучением светодиодного источника $\lambda = 660$ нм при плотности мощности 10 мВт/см²

Окраска йодистым пропидием

Контроль без облуч. Зверобой без облуч. Зверобой+обл.t=450 с



Концентрация хлорофилла а для всех экстрактов - $5,5 \times 10^{-7}$ М



Окраска МТТ-реагентом



1 – клетки (контроль без облучения); 2 – клетки с добавлением препарата на основе травы зверобоя (без облучения); клетки, сенсibilизированные экстрактом, при воздействии излучения светодиодного источника с $\lambda = 660$ нм при плотности мощности 10 мВт/см² в течении: 3 – $t = 150$ сек; 4 – $t = 300$ сек; 5 – $t = 450$ сек.