

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОРАНЖЕВО-КРАСНОЙ КОМПОНЕНТЫ ($\lambda_{\max}=626$ НМ) В СПЕКТРЕ МОДЕЛЬНОГО СОЛНЕЧНОГО СВЕТА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

¹Фахранурова Л.И., ¹Селезнева И.И., ²Манохин А.А., ¹Давыдова Г.А., ¹Храмов Р.Н.

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пуцино, Россия (142290, Московская обл., Пуцино, ул. Институтская, д.3), e-mail: LFakhranurova@gmail.com

²ФГБУН Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пуцино, Россия (142290, Московская обл., Пуцино, ул. Институтская, д.3).

Проведено исследование воздействия оранжево-красной компоненты ($\lambda_{\max}=626$ нм), полученной с помощью экранов, состоящих из люминофорсодержащих материалов, в спектре солнечного света на жизнеспособность клеток млекопитающих (фибробласты линии 3T3 clone NIH; эпителиальные клетки линии HEp-2 и клетки роговицы глаза кролика линии SIRC) в условиях in vitro. Проведенное нами исследование показало, что наличие даже небольшой по интенсивности дополнительной люминесцентной компоненты ($\lambda_{\max}=626$ нм) в спектре солнечного света приводит к стимуляции внутриклеточных процессов и повышению регенеративных возможностей организма, что выражается в увеличении жизнеспособности клеток по данным МТТ-теста. Это открывает перспективы применения светопреобразующих материалов для защиты тканей глаза от фотоповреждения и профилактики дистрофических и возрастных изменений макулярной области сетчатки.

Ключевые слова: биосовместимые светопреобразующие материалы, сетчатка глаза, цитопroteкция.

RESEARCH OF INFLUENCE OF ORANGE-RED COMPONENT ($\lambda_{\max}=626$ NM) IN MODEL SUNLIGHT SPECTRUM ON THE VIABILITY OF MAMMALIAN CELL IN VITRO

¹Fakhranurova L.I., ¹Selezneva I.I., ²Manokhin A.A., ¹Davidova G.A., ¹Khramov R.N.

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Russia (142290, Pushchino, Institutskaya street, 3); e-mail: LFakhranurova@gmail.com

²Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Russia (142290, Pushchino, Institutskaya street, 3)

We have done the study of the effect of orange-red component ($\lambda_{\max} = 626$ nm) in the solar spectrum, obtained through the screens consisting of luminophore materials, on the viability of mammalian cells (fibroblasts 3T3 clone NIH; epithelial cell line HEp-2 cells and rabbit cornea line SIRC) in vitro. Our study showed that the presence of even small-intensity fluorescent additional components ($\lambda_{\max} = 626$ nm) in the spectrum of sunlight leads to stimulation of intracellular processes and improve the regenerative abilities, resulting in an increase in cell viability according to the MTT assay. This opens up prospects of using light-converting material to protect the eye tissues from photodamage and prevention of degenerative and age-related changes in the macular area of the retina.

Keywords: biocompatible sun-converting materials, retina, cytoprotection.

Из года в год растет интерес к фототерапии при профилактике и лечении ряда заболеваний. Наиболее часто в фототерапии применяют низкоинтенсивное излучение лазеров и светодиодных ламп [3, 6]. Альтернативой является источник белого света, излучение которого модулируется с помощью светофильтров [7]. Предлагаемый нами подход основан на использовании преобразованного солнечного света (ПСС), получаемого при помощи светофильтров с включением полупроводниковых нанокристаллов или квантовых точек (КТ), преобразующих УФ-компоненту солнечного спектра в свет оранжево-красного диапазона ($\lambda_{\max}=626$ нм). В литературе имеются лишь единичные упоминания об использовании преобразованного таким образом солнечного света для биомодуляции

функций животных организмов, в частности при фотостимуляции репаративных процессов [5]. Целью данной работы было исследовать влияние оранжево-красной компоненты ($\lambda_{\max}=626$ нм) в спектре преобразованного модельного солнечного света на жизнеспособность клеток млекопитающих в условиях *in vitro*.

Материал и методы исследования

В качестве фотолюминофоров были взяты полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы CdSe/CdS (квантовые точки, КТ) размером 5-7 нм (НТИЦ «Нанотех-Дубна»). Спектры возбуждения и эмиссии КТ получали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Энергетическая освещённость световых потоков измерялась пиранометром SMP-3 (Kipp & Zonen, Нидерланды). Облучение клеток с помощью лабораторного осветителя ЛОС-1 (Россия) с ксеноновой лампой OSRAM XBO150 (мощность 150 Вт), излучение которой в видимом диапазоне и в УФ-диапазоне спектра близко к спектру излучения Солнца, падающего на поверхность Земли (*группа СС*). Светообразующие экраны были изготовлены из пластин полиметилфенилсилоксана (ПФМС) толщиной 0,5 мм, с включением 0,1% квантовых точек CdSe/CdS, получаемый при этом световой поток называли преобразованным солнечным светом (*группа ПСС*). В качестве контроля использовали такие же пластины ПФМС без включения квантовых точек, которые поглощали свет, в том числе в УФ-диапазоне в той же мере, как и светообразующие экраны (*группа СС-УФ*). Расчетные данные по дозам облучения при использовании различных режимов облучения приведены в таблице 1. Нагрев среды культивирования во время проведения эксперимента не превышал 0,1°C.

Таблица 1. Расчет экспозиционной дозы облучения при различных режимах.

Продолжительность облучения (сек)	Группа СС (Дж/см ²)	Группа СС-УФ (Дж/см ²)	Группа ПСС (Дж/см ²)
2	0,3	0,051	0,051
50	6,5	1,1	1,1
150	19	3,2	3,3
600	77	12,8	13,3
1200	154	25,6	26,6
1800	231	38,4	39,9

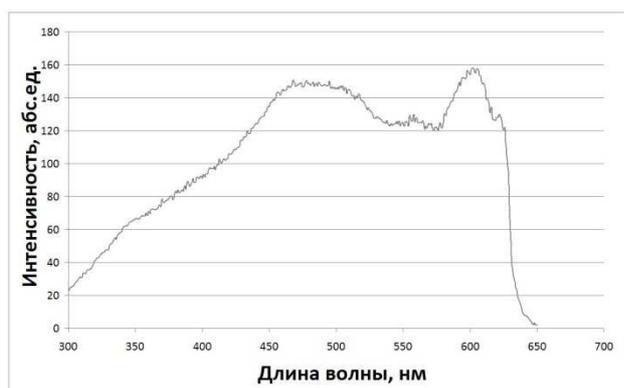
Исследование *in vitro* проводили с использованием фибробластов линии 3T3 clone NIH и эпителиальных клеток линии HEp-2 из коллекции клеточных культур Института Биофизики Клетки РАН, а также клеток роговицы глаза кролика линии SIRC (Коллекция культур клеток позвоночных). Клетки линии HEp-2 и SIRC культивировали в среде ДМЕМ/F12 (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; FBS

HyClone) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина в атмосфере 5% CO₂. Фибробласты культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% ЭТС. Клетки высевали на поверхность 96-луночных планшетов с плотностью 20 тыс.кл/см² и через 12 часов проводили облучение. Число параллельных экспериментов составляло не менее трех.

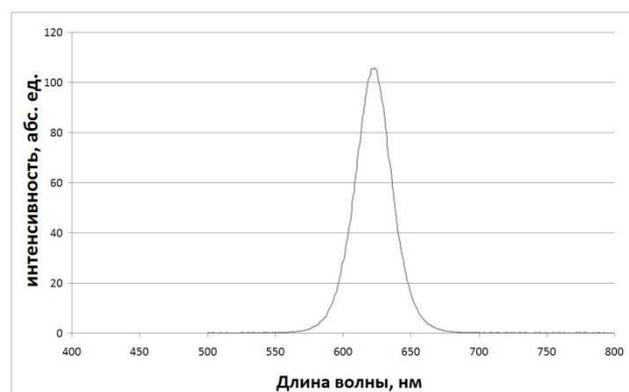
Определение жизнеспособности клеток проводили через сутки после облучения на микроскопе Axiovert 200 (Карл Цейс, Германия) с использованием окрашивания клеток набором L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen), в который входят два флуоресцентных красителя: SYTO 9 и иодид пропидия. Исследование метаболической активности клеток проводили с использованием МТТ-теста по методике, опубликованной ранее [1]. Обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Спектры возбуждения и эмиссии растворов квантовых точек измеряли в диапазоне длин волн от 300 до 800 нм (Рис. 1).



А



Б

Рисунок 1. Спектры возбуждения (А) и эмиссии (Б) квантовых точек CdSe/CdS в полиметилфенилсилоксане (ПФМС).

Для КТ характерна широкая полоса возбуждения флуоресценции, простирающаяся от УФ (300 нм) до красной области оптического спектра, и узкая симметричная полоса эмиссии в области 580-660 нм. Это позволяет получать люминесцентное излучение в оранжево-красном диапазоне при возбуждении не только ультрафиолетом, но и светом в видимой области спектра [2].

Проведенное исследование воздействия светового потока на жизнеспособность культуры фибробластов линии НИИ ЗТЗ показало, что воздействие света ксеноновой лампы (группа СС) приводит к зависимому от дозы облучения фотоповреждению клеток (Рис.2).

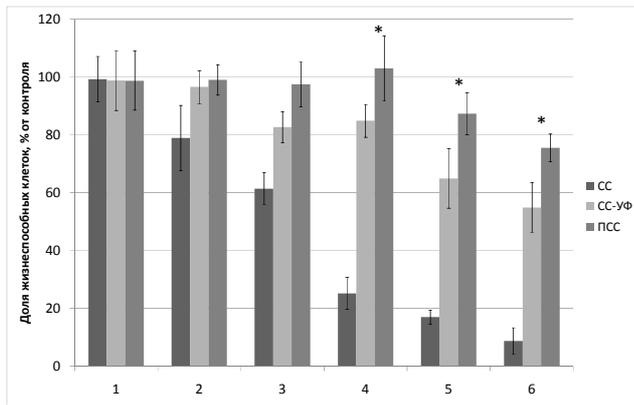


Рисунок 2. Жизнеспособность фибробластов 3Т3 clone N1H при различных временах облучения: 1) 2 сек; 2) 50 сек; 3) 150 сек; 4) 600 сек; 5) 1200 сек; 6) 1800 сек.

*-достоверные различия с ПСС с СС-УФ ($p \leq 0,05$; t-test). $M \pm SEM$.

При дозах облучения 0,3-19 Дж/см² не наблюдается значимого различия в защитном действии материалов, отсекающих УФ-компоненту (СС-УФ), и материалов с квантовыми точками (ПСС). Однако, при повышении дозы облучения с 77 Дж/см² до 231 Дж/см² материалы, отсекающие УФ-компоненту, не справляются с защитой клеток, в то время как материалы с добавлением КТ полностью защищают клетки, оказывая даже незначительное стимулирующее воздействие по сравнению с интактным контролем, принятым за 100% ($p \leq 0,05$). Эти данные показывают, что воздействие небольшой по интенсивности люминесцентной компоненты света оранжево-красного диапазона приводит к стимуляции внутриклеточных процессов, что приводит к повышению жизнеспособности клеток. Эти данные подтверждают гипотезу о биостимулирующем воздействии красного света [4].

Протекторный эффект от повреждающего действия солнечного света также был показан и на других типах клеток: эпителиальных клетках линии HEp2 и клетках роговицы глаза кролика SIRC (рис. 3).

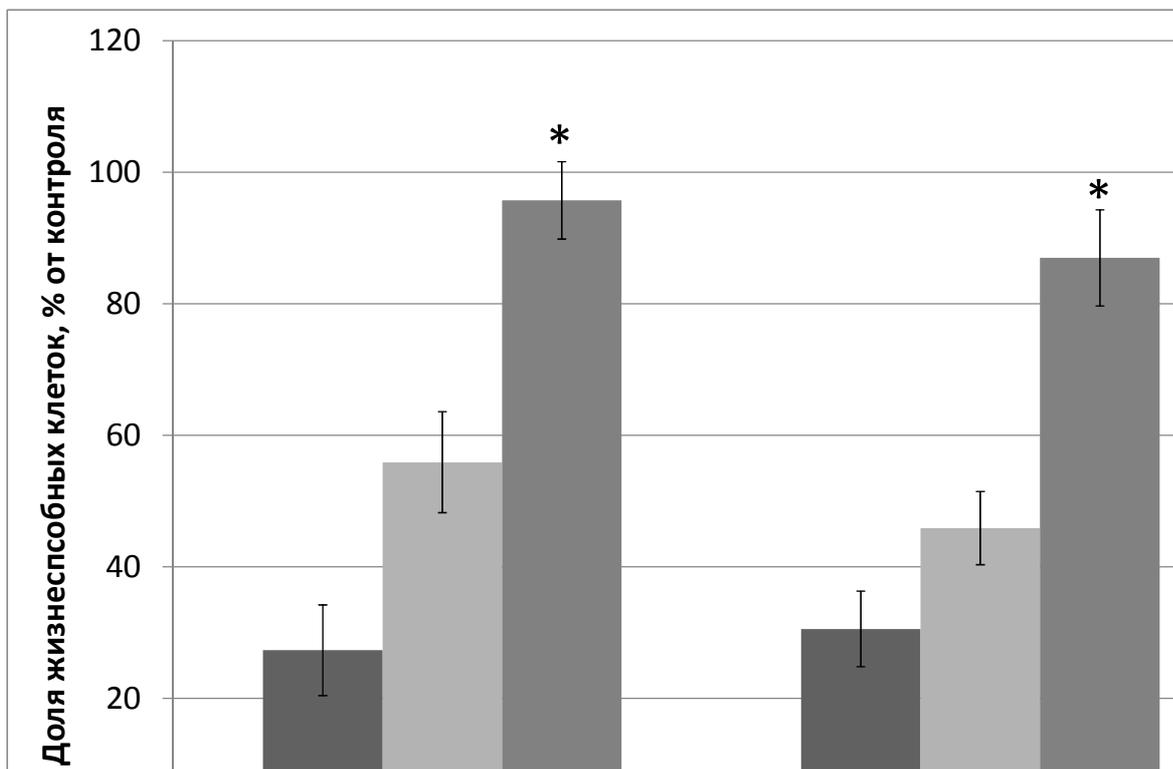


Рисунок 3. Жизнеспособность клеток линий HEp2 и SIRC (1800 сек облучения):

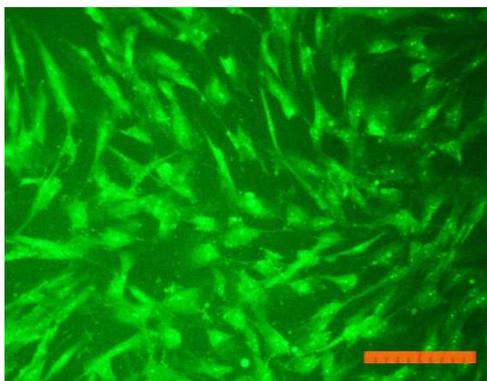
1) СС - 231 Дж/см²; 2) СС-УФ – 38,4 Дж/см²; 3) ПСС – 39,9 Дж/см².

*-достоверные различия с ПСС с СС-УФ ($p \leq 0,05$; t-test). $M \pm SEM$.

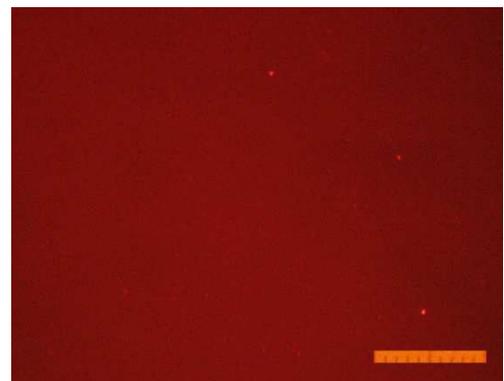
Внешний вид клеток, облученных солнечным светом в присутствии и в отсутствие фильтров, представлен на рис. 4. Флуоресцентный краситель SYTO 9 окрашивает все клетки в зеленый цвет, иодид пропидия окрашивает ядра погибших клеток в красный цвет, что позволяет подсчитать процент гибели клеток под воздействием облучения.

Контроль

A



B



СС

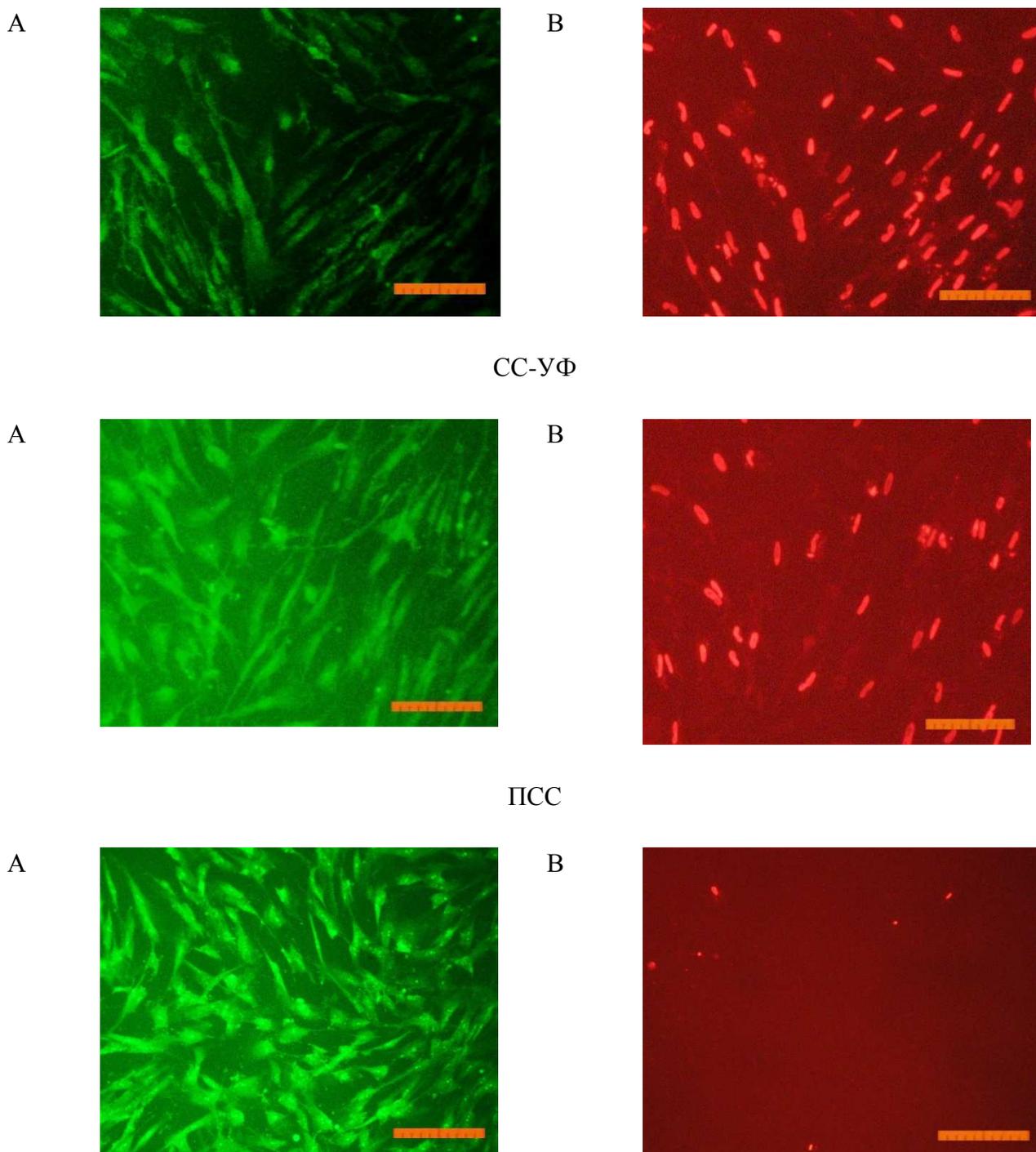


Рисунок 4. Внешний вид фибробластов линии 3T3 clone NIH. Флуоресцентное окрашивание SYTO 9 (A) и иодидом пропидия (B). Линейка 100 мкм

1) СС - 231 Дж/см²; 2) СС-УФ – 38,4 Дж/см²; 3) ПСС – 39,9 Дж/см².

Исследование показало, что максимальная гибель клеток (89%) наблюдается при воздействии света ксеноновой лампы (группа СС). При использовании экрана, отсекающего УФ-компоненту, количество мертвых клеток снижается до 36% (группа СС-УФ). При облучении преобразованным светом с дополнительной люминесцентной компонентой (группа ПСС) количество мертвых клеток такое же, как и в контроле (6% и 3% соответственно).

Вывод

Проведенное нами исследование показало, что наличие даже небольшой по интенсивности дополнительной люминесцентной компоненты ($\lambda_{\text{макс}}=626\text{нм}$) в спектре солнечного света приводит к стимуляции внутриклеточных процессов и возможному повышению регенераторных возможностей организма. Светопреобразующие материалы позволяют использовать солнечный спектр для возбуждения квантовых точек и формирования дополнительной люминесцентной компоненты с $\lambda_{\text{макс}}=626\text{нм}$, таким образом можно говорить о возможности применения данных материалов в новой технологии фототерапии, являющейся альтернативой использованию лазеров и светодиодов.

Спектроскопические измерения выполнялись при поддержке стипендии Президента (СП-6350.2013.4) и гранта РФФИ (14-44-03672). Определение жизнеспособности и метаболической активности клеток проводили при поддержке РФФ (14-25-00055).

Список литературы

1. Сычев А.Е., Вадченко С.Г., Камынина О.К., Балихина Е.Н., Плащина И.Г., Крылова Е.А., Григорьян А.С., Топоркова А.К., Коновалов А.Н., Селезнева И.И. Пористые материалы на основе Ti-Co сплавов как основа для гибридных имплантатов // Клет. техн. в биол. и мед. - 2009. - №1. - С.52-58.
2. Храмов Р.Н., Фахранурова Л.И., Паскевич С.И., Анисимов С.И., Манохин А.А., Симонова Н.Б, Давыдова Г.А., Селезнева И.И. Исследование воздействия солнечного света, преобразованного люминофорсодержащими материалами, на функциональное состояние клеток в условиях *in vitro* и *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. - №10. – т. 158– С. 436-440
3. Ablon G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings // Photomed Laser Surg. - 2010. - Feb. 28(1). - P. 141-6.
4. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MT, Henry MM, Buchmann EV, Connelly MP, Dovi JV, Liang HL, Henshel DS, Yeager RL, Millsap DS, Lim J, Gould LJ, Das R, Jett M, Hodgson BD, Margolis D, Whelan HT. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation // Photomed Laser Surg. - 2006. - 24(2). - P.121-8.
5. Khramov RN, Bratkova LR, Chemeris NN, Gapeev AB, Shchelokov RN, Sucharev SA From “Safe sun” strategy toward “useful sun” one // Biological effects of light. – 1995. – P. 192-95.

6. Oliveira PC, Meireles GC, dos Santos NR, de Carvalho CM, de Souza AP, dos Santos JN, Pinheiro AL. The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model // Photomed Laser Surg. - 2008. - 26(4). - P.289-99.
7. Saczko J., Kulbacka J., Chwiłkowska A., Drag-Zalesińska M., Wysocka T., Lugowski M., Banaś T. The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line // Folia Histochem Cytobiol. - 2005. - 43(3). - P.129-32.

Рецензенты:

Гапеев А.Б., д.ф-м.н., проф., ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, г.Пущино;

Белова Н.А., д.б.н., ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.Пущино.