

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КРАСИТЕЛЕЙ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А.А. АВЕТИСЯН*, М.Б. МАТЕВОСЯН**, В.А. ОГАНЕСЯН*, Е.Г. ЭЛБАКЯН*

*Ереванский физический институт, 375036

**Ереванский государственный университет, 375025

Исследовались фототоксичность фотосенсибилизаторов нового поколения - хлорина e_6 и фталоцианинов при разных температурах, а также явления при сочетании различных типов красителей с использованием линии *Drosophila melanogaster*. Показано, что при совместном применении света и фотодинамически активных красителей выживаемость дрозофил резко падала при повышении температуры, тогда как обычные красители не приводили к гибели насекомых при облучении и/или повышении температуры окружающей среды. Сочетание различных типов красителей в одних случаях приводило к увеличению фотодинамического воздействия, а в других - к частичному или практически полному исчезновению фотодинамического эффекта.

Աշխատանքը նվիրված է նոր սերնդի ֆոտոսենսիբիլիզատորների՝ ջլորին e_6 և ֆտալոցիանինների ֆոտոտոքսիկության ուսումնասիրմանը տարբեր ջերմաստիճաններում, ինչպես նաև այն երևույթների ուսումնասիրմանը, որոնք ի հայտ են գալիս տարբեր տիպի ներկանյութերի համատեղ կիրառման դեպքում, որպես փորձի օբյեկտ ընտրելով *Drosophila melanogaster* -ը: Ցույց է տրված, որ լույսի և ֆոտոդինամիկ տեսակետից ակտիվ ներկանյութերի համատեղ կիրառման ժամանակ դրոզոֆիլայի կենսունակությունը կտրուկ ընկնում է բարձր ջերմաստիճանների դեպքում, մինչդեռ սովորական ներկանյութերը չեն բերում միջատների ոչնչացմանը ճառագայթման և/կամ շրջակա միջավայրի ջերմաստիճանի բարձրացման դեպքում: Տարբեր տիպի ներկանյութերի համատեղ կիրառումը որոշ դեպքերում բերում էր ֆոտոդինամիկ ազդեցության ուժեղացմանը, իսկ այլ դեպքերում՝ ֆոտոդինամիկ էֆեկտի մասնակի կամ լրիվ վերացմանը:

The present work is dedicated to the investigation of new generation photosensitizers (chlorin e_6 and phthalocyanines) phototoxic activity by different temperatures, also the effects at combination of different dyes, using the model of *Drosophila melanogaster*. It has been shown that during the combination of light and photodynamically active dyes, the insects' survival was decreased while the temperature increased, whereas the simple dyes did not take to insects' destruction while illumination and/or environment temperature increasing. The combination of different dyes in some cases was affecting to the increasing of photodynamic effect, and in other cases to the particular or practically absolute disappearing of photodynamic effect.

Фотоиnсектициды - фотодинамика - хлорин e_n - фталоцианин

Наличие в пище определенных красителей, таких как акридиновый оранжевый (АО), приводит к гибели некоторых насекомых под солнечным светом. Это было показано еще в 1890 г. [9]. АО и другие красители с аналогичными свойствами были определены как фотосенсибилизаторы (ФС).

Была показана необходимость наличия кислорода для процесса фотосенсибилизации. Совместное действие трех факторов - света, ФС и кислорода было названо фотодинамическим процессом (ФДП). В настоящее время первичные физико-химические реакции при ФДП изучены довольно подробно и установлено, что в большинстве случаев первичным актом является генерация синглетного кислорода вследствие переноса энергии с возбужденного триплетного состояния красителя на неактивное триплетное состояние растворенного молекулярного кислорода. Синглетный кислород является чрезвычайно реакционным агентом, способным окислять любые биомолекулы, при этом в биосистемах отсутствуют биохимические защитные механизмы. Первые исследования по контролю популяций насекомых с использованием фотоактивных веществ (ксантенов) были проведены в работе Барбиери и др. [1], и было показано, что свет или ФС в отдельности не имеют токсичного эффекта. В дальнейшем исследования в этой области были расширены, с использованием целого ряда натуральных и синтетических фотодинамических инсектицидов, таких как ксантены, тиофены, акридины и др. Несмотря на различия в химических структурах ФС, основные закономерности проявления ФДП похожи: увеличение фототоксичности с увеличением дозы ФС, примерно одинаковые эффективные концентрации ФС для получения высокого уровня смертности насекомых, время проявления фотодинамического эффекта и т.д. [2-4, 7].

Фотодинамический эффект наблюдается во многих биологических системах. Фотосенсибилизированная инактивация дрожжей и бактерий используется для обеззараживания загрязненных микробами вод солнечным светом. Способность некоторых ФС накапливаться в значительных количествах, преимущественно в патологических тканях, таких как опухоли, атеромы или псориатические бляшки, стала предпосылкой для разработки нового фототерапевтического метода, который широко применяется для лечения и диагностики онкологических, инфекционных и других болезней [8].

Для увеличения лечебной эффективности фотодинамического метода в последнее время был синтезирован ряд новых красителей, обладающих большим сечением поглощения и квантовым выходом генерации синглетного кислорода.

Данная работа посвящена исследованию фототоксичности фотосенсибилизаторов нового поколения хлорин e_6 и фталоцианинов при разных температурах и различных явлениях при сочетании различных типов красителей с использованием линии *Drosophila melanogaster*.

Материал и методика. Опыты проведены на *Drosophila melanogaster* D-32 в лабораторных условиях. Культуры дрозофилы развивались в пробирках с сахарно-дрожжевой средой, которые хранили в термостате при температуре 22-25°. В качестве красителей использовали как фотодинамически активные сенсibilизаторы - хлорин e_6 (Институт молекулярной и атомной физики, г. Минск, Беларусь), Zn, Al и Mg фталоцианины (Fluka), родамин 6Ж, метиленовый синий. АО ("Реактив", Львов) (группа А), так и неактивные соединения- бриллиантовый зеленый, пиродин ("Реактив") и гемоглобин (группа Б). До начала опыта мух переводили в пустые пробирки (по 10-15

особей в пробирке) и через 1,5-2 ч вводили корм с добавлением одного или двух типов красителей. В процессе разработки методики было апробировано 2 способа введения мухам красителя - растворенного в густом сиропе или в сахарно-дрожжевой среде. Эксперименты проводили с концентрациями ФС в пределах 0,01-1 мМ. Примерно через сутки после введения корма проводили облучение.

В качестве фотостимулятора использовали солнечное излучение, узкодиапазонные галогенные лампы (540-570, 580-610, 650-700 нм), светодиоды (590, 630, 650, 670 нм) и П гармонику импульсного YAG:Nd лазера (532 нм) в зависимости от спектра поглощения красителя. Интенсивность облучения была не более 45 мВт/см² и экспозиция от 10 мин до 1.5 ч.

Результаты и обсуждение. *Исследование температурной зависимости ФДП.* На модели исследовали фотодинамическую активность ряда красителей в широком диапазоне температуры воздуха (15-35°) в экспериментальных пробирках. В контрольных пробирках (в темноте с красителем и облученные без красителя) выживаемость мух была 100% при всех применяемых дозах облучения и температурах.

Можно выделить 2 температурных режима облучения, при которых качественно различаются характер совместного воздействия света и красителей. При температурах до 25° с применением красителей группы Б выживаемость мух также была почти 100%, а при применении красителей группы А наблюдалась дозозависимая гибель (рис. 1). При высоких температурах (30-35°) при применении красителей группы Б мухи теряли подвижность.

При небольших экспозициях (до 10 мин) после прекращения облучения жизнеспособность мух полностью или частично восстанавливалась в зависимости от дозы облучения и концентрации красителя. При применении красителей группы А выживаемость дрозофил резко падала с повышением температуры. Гибель насекомых происходила в основном в течение первых суток после облучения (рис. 2), после чего численность мух практически не менялась, т.е. фотодинамические процессы завершаются к 24 ч после облучения. При высоких концентрациях красителей (~1мМ) гибель насекомых наблюдалась уже во время облучения, что свидетельствует о существовании механизмов, отличных от апоптоза. Из того обстоятельства, что мухи после прекращения облучения восстанавливались, следует, что красители группы Б не вызывали в облученном организме характерных для фотодинамического процесса биохимических реакций, приводящих через некоторое время к апоптозу или разрушению сенсibilизированных клеток. Увеличение фотодинамического эффекта при повышении температуры окружающей среды может иметь по крайней мере два различных механизма.

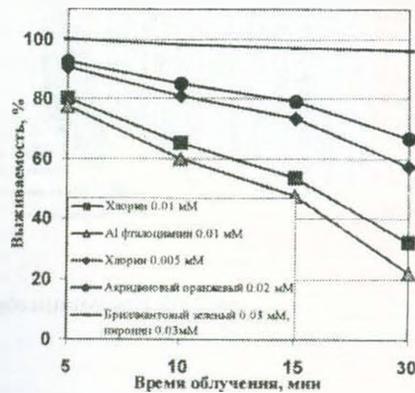


Рис.1. Выживаемость *Drosophila* при облучении солнечным светом 40 мВт/см².

Первый- высокие температуры ослабляют защитные функции всего организма, восстановление поврежденных клеточных компонентов происходит медленнее, и насекомые гибнут быстрее. Однако следует рассмотреть также другой механизм- при увеличении общей температуры или локальной температуры в местах накопления красителей происходит интенсификация ФДП. В каждом из этих двух случаев выбор красителя и оптимизация режимов применения фотохимического воздействия на биологические системы будут различными.

Эффективность фотодинамического воздействия при совместном применении двух красителей. Сочетание двух красителей в одних случаях приводило к увеличению фотодинамического воздействия (когда применялись широкополосное облучение и красители с взаимодополняющими спектрами поглощения, например, хлорин и фталоцианин), а в других случаях - к частичному (пиронин+ хлорин) или практически полному (бриллиантовый зеленый+хлорин) исчезновению фотодинамического эффекта (рис.2). Это скорее всего связано с тушением возбужденных состояний фотодинамического

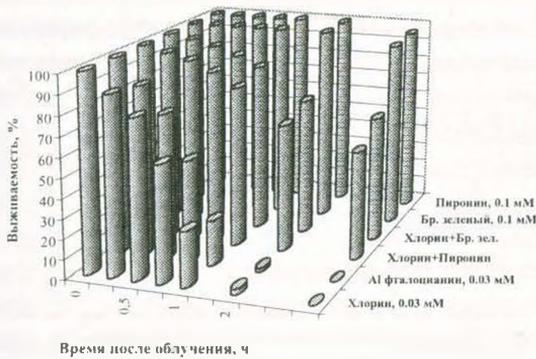


Рис. 2. Кинетика выживаемости *Drosophila* при облучении солнечным светом 40 мВт/см², 10 мин

красителя или синглетного кислорода неактивным красителем. Оценки показывают, что вследствие слабого поглощения (меньше 1%), оптической экранировкой излучения молекулами красителя можно пренебречь. Таким образом, показано, что фотодинамические красители второго поколения могут быть применены для экологически чистого контроля популяции насекомых. При этом в качестве источника фотоактивации ФДП может быть использовано солнечное излучение, интенсивность которого в летнее время достигает 70 мВт/см². Это позволяет обеспечить летальную дозу для насекомых примерно за 10 мин. Уменьшая концентрацию фотодинамически активного красителя или добавляя в корм тушитель ФДП, можно регулировать плотность насекомых в данной местности.

Фотоинсектициды представляют собой возможную альтернативу традиционным химическим инсектицидам, которым свойствен ряд недостатков, таких как токсичность для растений, животных и частично для людей, мутагенность, химическая стойкость, что приводит к загрязнению окружающей среды, и т.д. [5]. Фотодинамические соединения синтезируются или отбираются таким образом, чтобы темновая токсичность была бы на очень низком уровне и отсутствовал бы мутагенный эффект. К тому же

фотодинамические соединения под действием света разрушаются в течение 1-2 дней.

Выбранная нами экспериментальная модель также интересна с точки зрения исследования механизмов ФДП при разных температурах, так как дрозофилы могут долговременно существовать в широком диапазоне температур (+10 - +31°) [6], выявления первичных процессов при совместном применении красителей, а также изучения влияния ФДП на репродуктивные функции мух. Проведенные исследования могут помочь увеличить эффективность и безопасность фотодинамической терапии людей и расширить области применения ФДП в науке, медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Barbieri A.* Riv. Malariol, 7, 456-463, 1928.
2. *Ben Amor T. et al.* Photochem. Photobiol. 67, 206-211, 1998.
3. *Ben Amor T. and Jori G.* Insect. Biochem. Mol. Biol. 10, 915-925, 2000.
4. *Ben Amor T., Bortolotto L., Jori G.* Photochem. Photobiol. 71, 123-127, 2000.
5. *Ben Amor T and Jori G.* Photodynamics News. 6-8, 2001.
6. *Lints F.A., Lints C.V.* Nature New Biology., N.-Y., 229, 3, 86-88, 1971.
7. *Reibnitz C.A. J.* Photochem. Photobiol B: Biol., 18, 97-114, 1992.
8. *Anderson-Engels S., Johansson J., Svandberg S., Svandberg K.* Anal. Chem., 62, 19A - 27A, 1990.
9. *Spikes J.D.* Primary Photoprocesses in Biology and Medicine Plenum Press, Bensasson RV et al (Eds). New York, 209-227, 1985.

Поступила 06.X.2004

