

ЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ЭКСТРАКТУМ HYPÉRICUM PERFORÁTUM ПРИ ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В ЖЕЛТОМ СПЕКТРЕ



Ташкенбаева Умида Алишеровна¹, Мухамедова Муслима Рустамовна², Садыков Рустам Аббарович², Мусаева Шахло Нажатовна³

1 - Ташкентская медицинская академия, Республика Узбекистан, г. Ташкент;

2 - Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр хирургии имени академика В. Вахидова, Республика Узбекистан, г. Ташкент;

3 - Республиканский специализированный научно – практический медицинский Центр онкологии и радиологии, Республика Узбекистан, г. Ташкент

САРИҚ СПЕКТРДАГИ ЛАЗЕР ТАЪСИРИДА HYPÉRICUM PERFORÁTUM ЭКСТРАКТИНИНГ ЛИМФОЦИТОТОКСИК ЭФФЕКТИ

Ташкенбаева Умида Алишеровна¹, Мухамедова Муслима Рустамовна², Садыков Рустам Аббарович², Мусаева Шахло Нажатовна³

1 – Тошкент тиббиёт академияси, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.;

2 – Академик В.Вахидов номидаги республика ихтисослаштирилган хирургия илмий-амалий тиббиёт маркази, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.;

3 – Республика ихтисослаштирилган онкология ва радиология илмий – амалий тиббиёт маркази, Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.

LYMPHOCYTOTOXIC EFFECT OF EXTRACTUM HYPÉRICUM PERFORÁTUM UNDER LASER EXPOSURE IN THE YELLOW SPECTRUM

Tashkenbaeva Umida Alisherovna¹, Mukhamedova Muslima Rustamovna², Sadykov Rustam Abrarovich², Musaeva Shahlo Najatovna³

1 - Tashkent Medical Academy, Republic of Uzbekistan, Tashkent;

2 - Republican specialized scientific and practical medical center for surgery named after academician V. Vakhidov, Republic of Uzbekistan, Tashkent;

3 - Republican Specialized Scientific - Practical Medical Center of Oncology and Radiology, Republic of Uzbekistan, Tashkent

e-mail: rasadykov@mail.ru

Резюме. *Hypéricum perforátum* экстрактининг таркиби ўрганилди. Спектрофотометрик тадқиқотлар шуни кўрсатдики, препарат таркибида ютилиш спектри 560-580 нм бўлган гиперичин моддаси мавжуд. Фотохимёвий реакцияни қўзғатиш учун биз сариқ спектрда 580 нм лазер қурилмаси билан нурлантирдик - қувват зичлиги 500 мВт/см². Лимфоцитотоксик тестга кўра, *Hypéricum perforátum* экстракти лазер нури таъсирида лимфоцитларнинг нобуд бўлишига олиб келади ва фотодинамик таъсири метилен кўк фотосенсибилизаторга деярли тенглашади.

Калит сўзлар: *Hypéricum perforátum*, гиперичин, фотосенсибилизатор, лазер.

Abstract. *The composition of the extract of Hypéricum perforátum has been studied. Spectrophotometric studies demonstrated that the preparation contains hypericin with an absorption spectrum of 560-580nm. To excite the photochemical reaction we used a laser unit with radiation in yellow spectrum - 580nm with power density 500mW/cm². According to the data of lymphocytotoxic test it was found that the extract of Hypéricum perforátum causes a pronounced photodynamic effect manifested in the death of lymphocytes, comparable to the photosensitizer methylene blue.*

Keywords. *Hypéricum perforátum, hypericin, photosensitizer, laser.*

Актуальность проблемы. Фотосенсибилизаторы (ФС) – группа химических соединений, которые обладают способностью поглощать кванты световой энергии с выделением активного синглетного кислорода и кислородных радикалов. Подобная фотохимическая реакция возможна при

совпадении спектров поглощения ФС с источником световой энергии. Для возбуждения реакции требуется определенная плотность мощности излучения, выражаемая в мВт/см², а также кислородное обеспечение тканей. ФС различаются по интенсивности выделения кислородных радика-

лов, тропности к клеткам мишеням, а также растворимости в воде или жирах. Для фотодинамической терапии (ФДТ) через кожные покровы предпочтительно использовать жирорастворимые ФС, которые легче проходят в глубокие слои дермы. При использовании ФС в клинической практике имеет значение безвредность и биосовместимость, а также коммерческая стоимость [2, 3, 5, 10]. В связи с этим разработка и использование отечественных ФС в клинической практике является актуальной и еще нерешенной проблемой в нашей стране.

Цель исследований. Изучить цитотоксический эффект масляного экстракта *Nurégicum perforátum* под воздействием лазерного излучения в желтом спектре.

Материал и методы. Экспериментальные исследования выполнены сотрудниками ТМА в лаборатории экспериментальной хирургии ГУ РОСНПМЦХ имени акад. В. Вахидова. Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах массой 120-140 г., содержащихся в пластмассовых клетках (по 6 в клетке) при стандартизованных условиях вивария с относительной влажностью (50-60%), температуре (22 °С) и светового режима (по 12 ч темноты и света). Все эксперименты выполнены в соответствии с международными требованиями по гуманному отношению к лабораторным животным (Страсбург 1986г.).

Нами для исследований использован официально разрешенный к применению в качестве наружного средства масло Зверобой полученное из цветков *Nurégicum perforátum*. Химический состав препарата исследовался спектрофотометрически. Для сравнения использован известный фотосенсибилизатор - метиленовая синь (ФС-МС 0,01% раствор), относящийся к фенотиазиновым красителям. Все операции при работе с ростовыми средами и препаратами проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса. Буферы были приготовлены на бидистиллированной воде, отфильтрованы через мембранные фильтры (0,22 мкм «Millipore», Германия) и автоклавированы при 1,2 атм. в течение 30 мин. Стеклопосуда перед использованием предварительно стерилизована при 160°C в течение 120 мин. Оборудование, приспособления, посуда из полимерных материалов стерилизовались облучением ультрафиолетовым светом в течение 30 мин. Для исследований использованы: краситель-трипановый синий, физиологический

раствор, питательная среда RPMI1640, 10%-ая телячья эмбриональная сыворотка (ТЭС), лимфоидные клетки. Спектральные характеристики ФС-ГЦ в составе *Nurégicum perforátum* были исследованы спектрофотометрически при температуре 22°С в лабораторных условиях

Результаты и обсуждение. Лазерная установка Optiscan (Италия 2023г) является изделием медицинской. По степени электробезопасности относится к классу II, группа ВF по ГОСТ Р 50267.0-92. По лазерной безопасности аппарат соответствует "Санитарным нормам и правилам устройства и эксплуатации лазеров" N 5804-92 для класса II по степени опасности генерируемого излучения (рис. 1). Длина волны излучения 0,580мкм (желтый спектр), мощность до 5Вт. Площадь сканированного воздействия 1x1см.



Рис. 1. Диодный высокоэнергетический лазер Optiscan Class 11B Qanta System S.p.A. Via Acquedotto.109 21017 – samarate (VA). ITALY

Согласно проведенным исследованиям спектр поглощения гипереецина (ФС-ГЦ), который находится в составе препарата приходится на 550-580нм, (рис. 2), что соответствует данным литературы [10]. Методика забора лимфоцитов - под общей анестезией парами изофлюрана крыса фиксировалась на манипуляционном столике в положении на спине. Производилась срединная лапаротомия. Производили забор лимфатических узлов из корня брыжейки кишечника. В стерильной ступке осторожно, с использованием стеклянной палочки, выдавливали содержимое лимфатических узлов.

Таблица 1. Параметры лазерного излучения, использованные в процессе исследований.

№	Параметр	Возможности установки	В эксперименте
1.	Средняя мощность	До 5 Вт	До 1Вт
2.	Длительность импульса	Минимально 1мсек	3мсек
3.	Площадь воздействия	Сканирование произвольное	Сканирование 1см ²
4.	Энергия	До 40Дж/см ²	0,1Дж/см ²

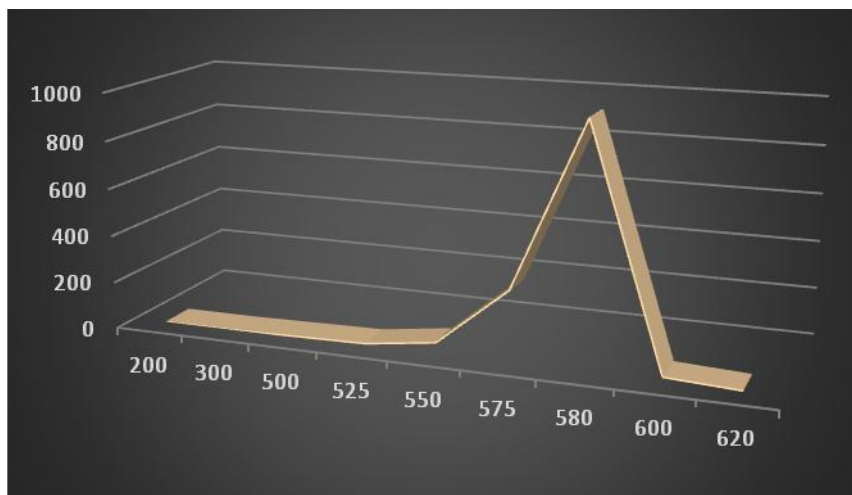


Рис. 2. Спектр поглощения фотосенсибилизатора ФС-ГЦ– в составе экстракта *Nuregicum perforatum* по данным спектрофотометрии

Таблица 2. Определение цитотоксичности ФС-МС и ФС-ГЦ на клетках лимфоцитах

Группы	Общее количество клеток	Количество живых клеток	Количество мертвых клеток	Цитотоксический индекс, %
Контроль	100	96+4	4+1	4
ФС-МС	100	2+6*	98+7*	98
ФС-ГЦ	100	30+8*	70+9*	70

Примечание: * - $P \leq 0,05$ в сравнении с контролем

Полученную массу помещали в термостат в стерильных пробирках с питательным раствором, при температуре 37° на 45 мин. После инкубации смесь лимфоцитов разделяли на 5 частей: 1- добавляли ФС-ГЦ в из расчета 0,1мл на 1 мл раствора; 2- облучали лазером с энергией $0,1 \text{ Дж} / \text{см}^2$; 3- после добавления ФС-ГЦ облучали лазером с энергией $0,1 \text{ Дж} / \text{см}^2$; 4- после добавления ФС-МС облучали лазером с энергией $0,1 \text{ Дж} / \text{см}^2$; 5-контроль. После инкубации в течение 45 минут к 0,2 мл суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,1 мл 0,5% в 0,9%-м растворе хлорида натрия), инкубировали с красителем 10 минут. Мазки из лимфатической ткани наносили на обезжиренные предметные стекла. Далее наносили раствор по Майн Грюнвальду на 4–6 мин, после чего дифференцировали в 70%-м растворе этилового спирта под контролем микроскопа. Подсчет клеточных элементов в мазках производили шаговым способом при увеличении в 450 раз. Для получения

достоверных результатов считали 100 клеток. Выделение клеточных элементов проводили согласно Международной гистологической номенклатуре [9]. Цитотоксический индекс (ЦТИ) рассчитывали по формуле: (число погибших клеток/общее число клеток) $\times 100\%$. Фотосъемку препаратов производили при помощи встроенной цифровой камеры при увеличении $10 \times 2,3$ и $40 \times 2,3$, а разрешение полученных изображений – 2048×1536 пикселей. Подсчет живых и мертвых клеток с помощью окраски трипанового синего показал, что в контроле подавляющее большинство клеток были живыми (98/100 клеток) (табл. 2 и рис. 3). После инкубации клеток с ФС-МС в течение 30 мин количество живых клеток уменьшилось до 2/100, а количество мертвых клеток выросло до 98/100 (рис. 4). При использовании ФС-ГЦ количество живых клеток уменьшилось до 30/100, а количество мертвых клеток выросло до 70/100 (рис. 5).

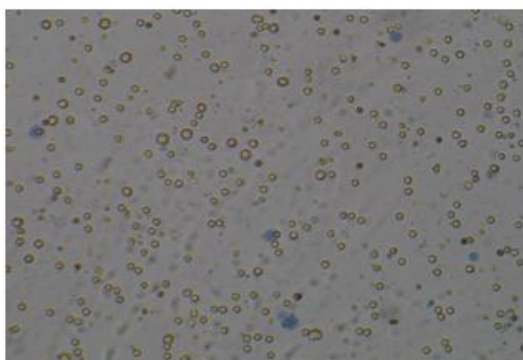


Рис. 3. Контроль. Цитотоксический тест с лимфоцитами



Рис. 4. Опыт. Цитотоксический тест с ФС-МС и облучение лазером

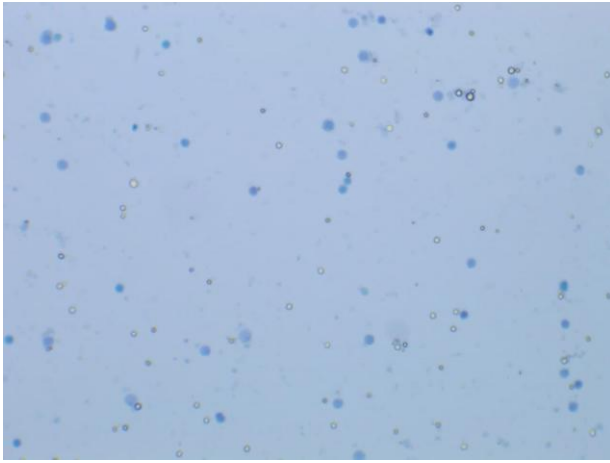


Рис. 5. Опыт. Цитотоксический тест ФС-ГЦ с лазерным облучением

В результате исследований было установлено, что ФС-ГЦ проявляет цитотоксический фотодинамический эффект ($p \leq 0,05$), который по активности приближается к эффективности ФС-МС.

Заключение. Изучен масляный экстракт растения *Hypericum perforatum*. Спектрофотометрические исследования продемонстрировали наличие в составе препарата вещества со спектром поглощения 560-580нм, что соответствует гиперину, который известен как фотосенсибилизатор, используемый в лечении опухолей и активно пролиферирующих тканей. Для оценки биологического действия препарата, нами проведен лимфоцитотоксический тест. В результате нескольких серий исследований было установлено, что в составе официального разрешенного для наружного применения масляного экстракта из цветков *Hypericum perforatum* имеется гиперин, который при облучения лазерным излучением в спектре 580нм с плотностью мощности 500мВт/см², способен вызвать фотодинамический эффект по активности сравнимый с фотосенсибилизатором метиленовая синь. Таким образом, по результатам проведенных исследований препарат может быть использован в дерматологии как активный фотосенсибилизатор при наружном применении.

Литература:

1. Абдувалиев А.А., Гильдиева М.С., Татарский В.П.. Модификация метода прижизненного окрашивания клеток трипановым синим для определения апоптоза//Методические рекомендации. – Ташкент. – 2002. – 18 с. 2
2. Использование фотодинамической терапии в лечении фотоповреждений кожи (обзор литературы) С.И. Суркичин, Н.В. Грязева, Л.С. Холупова, Н.В. Бочкова, Медицинский алфавит №7/2019, том №1. Дерматология
3. Круглова Л.С., Дзыбова Э.М., Пониц Е.С., Федотова К.Ю. Перспективы применения

фотодинамической терапии в дерматологии и косметологии: обзор исследований. Вестник эстетической медицины. 2014. Т. 13. № 3-4. С. 10-19.

4. Кузнецов А.В. Новый способ забора лимфы у животных // Бюл. эксперим. биол. мед. 1993. (9). 329–331
5. Лотти Т., Росси Р., Козловская В.В., Адаскевич В.П. Применение местной фотодинамической терапии в дерматологии. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2008. № 4. С. 55-58.
6. Семченко В.В., Самусев Р.П., Моисеев М.В., Колосова З.Л. Международная гистологическая номенклатура. Омск: Омская государственная медицинская академия, 1999. 156 с. 5. Чернух А.М., Александров П
7. Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C., Mourão, F. A., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., & Brito-Melo, G. E. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry // Brazilian journal of medical and biological research. 2014, 47(4). P. 307–315. doi.org/10.1590/1414-431X20143437.3
8. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability // Current protocols in immunology. 2015, 111,
9. 20. Tsibranska S, Ivanova A, Tcholakova S and Denkov N (2017) Self-Assembly of Escin Molecules at the Air-Water Interface as Studied by Molecular Dynamics. *Langmuir* 33:8330-8341.
10. Zhang J, Shao L, Wu C, Lu H, Xu R. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis of myeloma SP2/0 cells depended on caspase activity in vitro..*Cancer Cell Int.* 2014 Dec 19;15:58.

ЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ EXTRACTUM HYPERICUM PERFORATUM ПРИ ЛАЗЕРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ В ЖЕЛТОМ СПЕКТРЕ

Ташкенбаева У.А., Мухамедова М.Р., Садыков Р.А.,
Мусаева Ш.Н.

Резюме. Изучен состав экстракта *Hypericum perforatum*. Спектрофотометрические исследования продемонстрировали, что в составе препарата имеется гиперин со спектром поглощения 560-580нм. Для возбуждения фотохимической реакции нами была использована лазерная установка с излучением в желтом спектре – 580нм с плотностью мощности 500мВт/см². По данным лимфоцитотоксического теста установлено, что экстракт *Hypericum perforatum* вызывает выраженный фотодинамический эффект проявляющийся в гибели лимфоцитов, сопоставимый с фотосенсибилизатором метиленовой синью.

Ключевые слова. *Hypericum perforatum*, гиперин, фотосенсибилизатор, лазер.