

СВЕТОДИОДНЫЙ ИЗЛУЧАТЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ *in vitro* СВЕТОВОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

УДК 615.831:667.2.001.5
Поступила 25.12.2013 г.

© **Н.Ю. Шилиягина**, младший научный сотрудник кафедры биофизики¹;
В.И. Плеханов, ведущий технолог лаборатории биофотоники²;
И.В. Шкунов, ведущий конструктор лаборатории биофотоники²;
П.А. Шилиягин, к.ф.-м.н., научный сотрудник отдела нанооптики и высокочувствительных оптических измерений²;
Л.В. Дубасова, аспирант, младший научный сотрудник кафедры биофизики¹;
А.А. Брилкина, к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии растений¹;
Е.А. Соколова, аспирант, инженер лаборатории клеточных технологий НИИ «Институт живых систем»¹;
И.В. Турчин, к.ф.-м.н., зав. отделом радиофизических методов в медицине²;
И.В. Балалаева, к.б.н., зав. лабораторией клеточных технологий НИИ «Институт живых систем», доцент кафедры биофизики¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, 603950, ул. Ульянова, 46

Цель исследования — создание светодиодного излучателя для получения равномерного светового потока в 96-луночных планшетах с возможностью независимого светового воздействия на индивидуальные группы лунок, а также его экспериментальная апробация в исследовании *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии.

Материалы и методы. Работа выполнена на клеточных линиях эпидермоидной карциномы кожи человека А-431 и карциномы мочевого пузыря человека Т24. Использованы препарат для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии Фотосенс® и новосинтезированные наночастицы на основе полимерных щеток, допированных порфиразиновым хромофором. Для исследования световой активности препаратов создан излучатель со сменными светодиодными матрицами. Анализ фотодинамической активности *in vitro* фотосенсибилизаторов выполнялся с помощью МТТ-теста.

Результаты. Разработанный светодиодный излучатель позволяет проводить облучение культур клеток узкополосным излучением на разных длинах волн с интенсивностями до 90 мВт/см² с прецизионным контролем температурного режима во время проведения исследований. Нестабильность световой мощности после выхода в рабочий режим не превышает 1%. Предусмотрено независимое включение/выключение кластеров светодиодов по 4 элемента, что обеспечивает возможность параллельного облучения нескольких групп лунок стандартного 96-луночного культурального планшета различными световыми дозами. Созданная установка апробирована при исследовании световой активности препаратов для фотодинамической терапии: получена зависимость фототоксичности препарата Фотосенс® от дозы света и показано наличие значительной световой активности для новосинтезированного флуорофора из класса порфиразинов.

Заключение. Созданный светодиодный излучатель со сменными светодиодными матрицами с узкополосным излучением обеспечивает качественное и производительное исследование *in vitro* световой активности препаратов. Реализованный подход позволяет осуществлять эффективный и очень быстрый скрининг новых соединений с целью выявления наиболее перспективных для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Ключевые слова: светодиодный излучатель; фотосенсибилизатор; фотодинамическая активность; культура опухолевых клеток.

English

LED Light Source for *in vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy

N.Y. Shilyagina, Junior Researcher, the Department of Biophysics¹;
V.I. Plekhanov, Leading Production Engineer, Biophotonics Laboratory²;

Для контактов: Шилиягина Наталья Юрьевна, тел. раб. 8(831)465-61-06, тел. моб. +7 962-516-06-05; e-mail: nat-lekanova@yandex.ru

I.V. Shkunov, Principal Design Engineer, Biophotonics Laboratory²;
P.A. Shilyagin, PhD, Research Worker, Nano-optics and Highly Sensitive Optical Measurement Department²;
L.V. Dubasova, Postgraduate, Junior Researcher, the Department of Biophysics¹;
A.A. Brilkina, PhD, Associate Professor, the Department of Biochemistry and Plant Physiology¹;
E.A. Sokolova, Postgraduate, Engineer of the Laboratory of Cell Technologies, Institute of living systems¹;
I.V. Turchin, PhD, Head of the Department for Radiophysics Methods in Medicine²;
I.V. Balalaeva, PhD, Head of the Laboratory of Cell Technologies, Institute of Living Systems, Associate Professor, the Department of Biophysics¹

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Prospekt Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

²Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, Ul'yanova St., 46, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950

The aim of the investigation was to develop a LED light source providing a homogeneous light distribution in 96-well plates and allowing an independent irradiation of individual wells, as well as its experimental testing in *in vitro* study of photosensitizers for photodynamic therapy.

Materials and Methods. The experiments were carried out on human cell lines of epidermoid carcinoma A-431 and human bladder carcinoma T24. Two photosensitizers for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy were used: Photosens[®], and newly synthesized polymer brushes nanoparticles doped with porphyrazine chromophore. To study the photo-activity of the agents we created a light source with replaceable LED-arrays. Photodynamic activity of the photosensitizers was estimated *in vitro* by MTT assay.

Results. The created LED light source enables to expose cell cultures with narrow-band irradiation with different wavelengths and radiation intensity being up to 90 mW/cm². Precision control of temperature conditions during the investigation is provided. Light power instability is less than 1%. Independent on and off switching of LED clusters of 4 elements is provided in order to illuminate several wells groups of a standard 96-well culture plate with different light doses simultaneously. The developed light source was tested in the study of photo-activity of agents for photodynamic therapy. The dependence of Photosens[®] toxicity on the light dose was evaluated and significant photodynamic activity of newly synthesized porphyrazine fluorophore was demonstrated.

Conclusion. A newly developed LED light source with replaceable LED-arrays with narrow spectral bands provides an effective *in vitro* study of photosensitizing preparations under development. The state-of-the-art approach enables high throughput screening of promising agents for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy.

Key words: LED light source; photosensitizer; photodynamic activity; tumor cell culture.

При разработке препаратов для фотодинамической терапии необходимым шагом является исследование их функциональных свойств на клеточных культурах. Анализ световой, или фотодинамической, активности в системе *in vitro* позволяет проводить скрининг потенциальных фотосенсибилизаторов, осуществлять подбор концентраций, а также оценивать дозу оптического излучения, необходимую для проявления фотодинамического эффекта.

Несмотря на большое количество описанных в литературе методов оценки фотодинамической активности потенциальных фотосенсибилизаторов на клеточных культурах, единого подхода для этих исследований до сих пор не выработано. Одним из ключевых признаков, по которым можно классифицировать все известные методики исследования световой токсичности нового препарата, является выбор источника излучения. Многие исследовательские группы используют источники широкополосного излучения, такие как газоразрядные галогеновые лампы, лампы накаливания, «белые» светодиоды [1–9]. У этого подхода есть ряд недостатков, важнейшим из которых является избыточная световая мощность, воздействующая на клеточную культуру, поскольку спектр излучения источников белого света в несколько раз шире спектра поглощения фото-

сенсибилизаторов (типичная ширина полосы поглощения около 50 нм [10–14]). Излучение, выходящее за границы этой спектральной полосы, вызывает нежелательный нагрев клеток и приводит к побочным фотохимическим реакциям, что, в свою очередь, может существенно затруднить интерпретацию результатов эксперимента.

Для выделения необходимой области спектра могут быть использованы методы дополнительной спектральной фильтрации, однако такой путь приводит к значительному усложнению лабораторной системы [5, 8, 15].

В клинической практике для проведения процедур фотодинамической терапии используются узкополосные лазерные и светодиодные источники излучения [16, 17]. Это обусловлено в том числе относительной простотой направленной доставки такого излучения посредством гибких оптических волокон при обеспечении необходимой спектральной плотности мощности. При работе на клеточных культурах представляется методологически верным также использовать узкополосные источники, что позволяет исследовать световую активность препаратов в условиях, максимально приближенных к клиническим [18–21].

Важным параметром является размер области

светового воздействия, который определяет возможности работы с культуральными сосудами разной площади. Облучение клеток в чашках Петри диаметром 35–60 мм с использованием распределенных источников света (размер светового пятна более 1 см²) [19, 22, 23] в значительной степени затрудняет проведение экспериментов с большим числом биологических повторностей. Такой подход требует значительных объемов используемых расходных материалов и существенных временных затрат, обусловленных невозможностью одновременного облучения экспериментальных образцов. В связи с этим более удобным представляется использование многоруночных планшетов [18, 20, 21, 24, 25].

Несмотря на то, что одновременное облучение всей площади планшета обеспечивает тождественность условий для всех лунок, оно не позволяет в одном эксперименте оценить влияние различных световых доз. В то же время определение зависимости величины фотодинамического эффекта от дозы излучения является необходимым шагом исследования свойств потенциальных агентов для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Цель исследования — создание светодиодного излучателя для получения равномерного светового потока в 96-луночных планшетах с возможностью независимого светового воздействия на индивидуальные группы лунок, а также его экспериментальная апробация в исследовании *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Использованы клеточные линии эпидермоидной карциномы кожи человека A-431 (ATCC® CRL-1555™; предоставлена ИБХ РАН, Россия) и карциномы мочевого пузыря человека T24 (ATCC® HTB4™; НИИ вирусологии РАМН, Россия). Клетки линии A-431 культивировали в среде ДМЕМ («ПанЭко», Россия), клетки линии T24 — в среде «Игла MEM» («ПанЭко», Россия). Ростовые среды содержали 10% эмбриональной телячьей сыворот-

ки (HyClone, США) и 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C и атмосфере 5% CO₂, на каждом этапе пассирования клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия).

Фотосенсибилизаторы. В работе использован препарат для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии Фотосенс® (Государственный научный центр «НИОПИК», Россия), представляющий собой раствор смеси натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия (от ди- до тетразамещенного) в дистиллированной воде [26].

Исследована световая активность наночастиц на основе полимерных щеток, допированных тетра(4-фторфенил)тетрацианопорфиразином (далее обозначен как Pz) [27]. Pz характеризуется поглощением в красной области спектра с максимумом при длине волны 613 нм (раствор в тетрагидрофуране) и флюоресценцией с максимумом при 660 нм.

Светодиодный излучатель для создания равномерного светового потока в 96-луночных планшетах. Для исследования фотодинамической активности препаратов создан светодиодный излучатель, состоящий из следующих блоков (рис. 1): сменной светодиодной матрицы, блока управления и термостата.

При изготовлении светодиодной матрицы использованы 96 идентичных малогабаритных светодиодов для поверхностного монтажа (SMD) серии HPL-N44 производства High Power Lighting Corporation (Тайвань) с размерами основания 4,4×4,4 мм и потребляемой мощностью 1 Вт/кристалл. Встроенная в корпус светодиода фокусирующая линза обеспечивает эффективный сбор излучения и формирование узкой (30°) диаграммы направленности при миниатюрных размерах элемента матрицы. Встроенный в корпус теплоотвод позволяет получить высокую выходную мощность (до 100 мВт/кристалл) при долговременной стабильной работе устройства.

Созданный нами источник со сменными светодиодными матрицами с узкополосным излучением обеспечивает эффективное и производительное

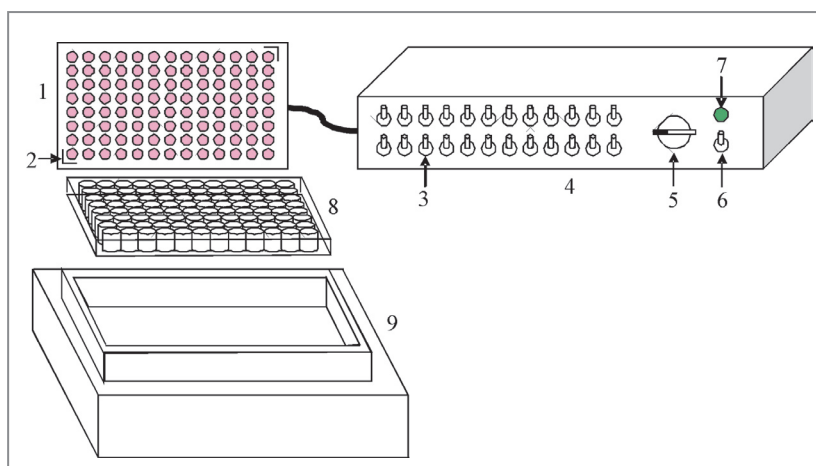


Рис. 1. Светодиодный излучатель для создания равномерного светового потока в 96-луночных планшетах: 1 — сменная светодиодная матрица; 2 — направляющие элементы; 3 — переключатели кластеров светодиодов; 4 — блок управления; 5 — регулятор мощности; 6 — тумблер включения/выключения питания; 7 — индикаторная лампа; 8 — 96-луночный планшет; 9 — термостат

облучение многолучных планшетов. При проведении экспериментальных клеточных исследований выбор центральной длины волны излучения светодиодов обусловлен спектральными характеристиками поглощения фотосенсибилизаторов. При этом доступный для описываемой технологии изготовления светодиодных матриц спектральный диапазон ограничен лишь номенклатурой мощных малогабаритных SMD-светодиодов со встроенной в корпус коллимирующей оптикой, представленной на рынке (например, в красной области спектра, наиболее интересной с точки зрения фотодинамического воздействия, — до 680 нм). Для экспериментальной апробации в соответствии со спектральными характеристиками поглощения исследуемых фотосенсибилизаторов были изготовлены две сменные светодиодные матрицы с центральными длинами волн 590 и 625 нм и шириной спектра излучения 20 нм по уровню половинной мощности. Каждая из матриц смонтирована на массивном теплопроводящем основании, служащем для обеспечения жесткости конструкции и отвода избыточного тепла, выделяемого светодиодами. При использовании высоких мощностей излучения предусмотрена установка на основание матрицы дополнительного радиатора с принудительным воздушным охлаждением. Габаритные размеры матриц совпадают с размером стандартного 96-луночного культурального планшета. Каждый из миниатюрных светодиодов расположен по центру соответствующей лунки планшета.

Важной отличительной особенностью является расположение матрицы над облучаемым планшетом, что позволяет использовать излучатель со стандартными термостатами, предназначенными для работы с многолучными планшетами, и обеспечивать прецизионный контроль температурного режима во время проведения эксперимента. Для точной установки матрицы основание содержит направляющие элементы. В данной работе был использован термостат ThermoStat plus (Eppendorf, Германия).

Блок управления установкой представляет собой многопортовый блок питания, обеспечивающий плавную регулировку мощности. Светодиоды сгруппированы в 24 независимо коммутируемых линейных кластера по 4 элемента, каждому из которых соответствует переключатель на лицевой панели блока управления установкой.

Измерение плотности мощности светового потока, проходящего через дно лунки планшета, проводили с помощью измерителя мощности оптического излучения PM100A (Thorlabs, США) с детекторной головкой S121C. При измерении детекторная головка помещалась под лунку планшета вплотную к ее дну, таким образом, чтобы их центры совпадали. Регистрируемая мощность излучения нормировалась на величину площади светочувствительной области детектора (0,71 см²). При расчете усреднен-

ных значений измерения проводили последовательно для всех светодиодов в матрице.

При анализе равномерности распределения интенсивности излучения по площади получали фотографическое изображение дна планшета через лист рассеивателя, закрепленный на дне планшета перед фотокамерой. Путем численного анализа изображения определяли среднюю интенсивность по индивидуальным лункам планшета. На основе гистограммы распределения интенсивности излучения, усредненной по площади лунки, рассчитывали отношение средних значений интенсивностей в центральной и периферической частях планшета.

Плотность мощности, проходящей через дно лунки планшета, может быть задана в диапазоне от 1,2 до 30 мВт/см² для светодиодов 590 нм и от 2,6 до 90 мВт/см² для светодиодов 625 нм. Для исследований на культурах клеток в данной работе использовали излучение со значением плотности мощности 20 мВт/см², при котором еще не наблюдаются термические эффекты. Вместе с тем время накопления использованных в работе доз излучения (до 15 Дж/см²) не превышало 12,5 мин, что позволило проводить облучение вне условий клеточного инкубатора.

Анализ световой активности фотосенсибилизаторов. Клетки рассеивали на 96-луночный планшет в количестве $3 \cdot 10^3$ на лунку и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение ночи. Затем питательную среду в целевых лунках культурального планшета заменяли 200 мкл среды с фотосенсибилизатором и инкубировали клетки в течение 6 или 24 ч при работе с фотосенсом или наночастицами, допированными Pz, соответственно. После окончания инкубации с фотосенсибилизатором среда в лунках планшета заменялась на соответствующую ростовую питательную среду. Клетки облучали с помощью светодиодного излучателя. Доза облучения контролировалась длительностью освещения и составляла от 1,3 до 15 Дж/см² при плотности мощности 20 мВт/см².

Через 24 ч после облучения жизнеспособность клеточной культуры оценивали с помощью МТТ-теста [28]. Для этого в ростовую среду вносили 3(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ-реагент, Alfa Aesar, Великобритания) до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали клетки в течение 4 ч. Далее инкубационную среду отбирали, а кристаллы образованного окрашенного МТТ-формаза растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). Измерение оптической плотности содержимого каждой лунки проводили на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США) на длине волны 570 нм. Жизнеспособность клеток оценивали по отношению значения оптической плотности раствора формаза в каждой пробе к контролю (без облучения). На графиках представ-

лены средние арифметические значения и стандартные отклонения.

Результаты

Временная стабильность характеристик и равномерность распределения интенсивности излучения по площади планшета. Созданный излучатель со сменными светодиодными матрицами позволяет проводить облучение культур клеток с интенсивностями до 90 мВт/см^2 на длине волны 625 нм и до 30 мВт/см^2 на 590 нм , что обеспечивает накопление необходимых для фотодинамического эффекта доз за относительно короткие промежутки времени (единицы минут). Относительное изменение интенсивности, измеренное в течение 30 мин для матрицы 625 нм при двух режимах работы (20 и 40 мВт/см^2), составило менее 1% (рис. 2) при времени установления рабочего режима не более 1 мин с момента включения.

Узкая диаграмма направленности использованных светодиодных источников обеспечивает попадание основной части интенсивности излучения на дно «целевой» лунки планшета. Тем не менее необходимо учитывать попадание некоторой части излучения в соседние лунки. В связи с этим была выделена центральная часть планшета (60 лунок), в которой все лунки находятся в идентичных условиях, и краевые ряды лунок (36 лунок). Фотографическое изображение планшета, полученное через лист рассеивателя, закрепленный на дне планшета перед фотокамерой, представлено на рис. 3, а. Согласно результатам численного анализа изображения (рис. 3, б), средняя интенсивность в периферийной части планшета на $10\text{--}15\%$ ниже, чем в центральной. Распределение интенсивности в индивидуальных лунках планшета для обеих зон может быть описано нормальным за-

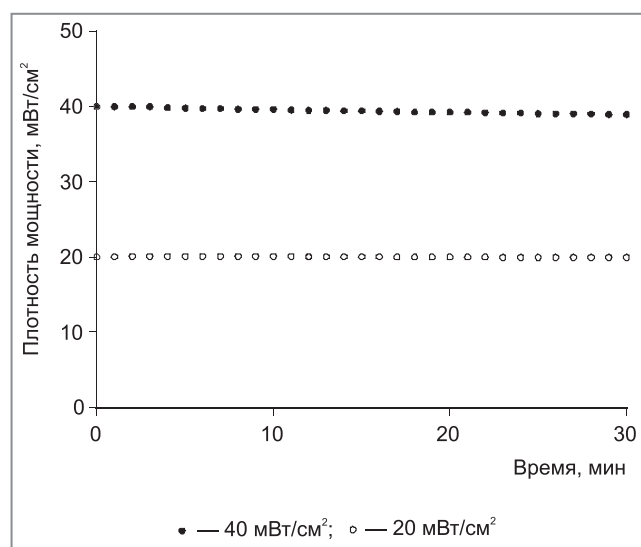


Рис. 2. Временная стабильность излучения светодиодного излучателя с матрицей 625 нм после выхода в рабочий режим

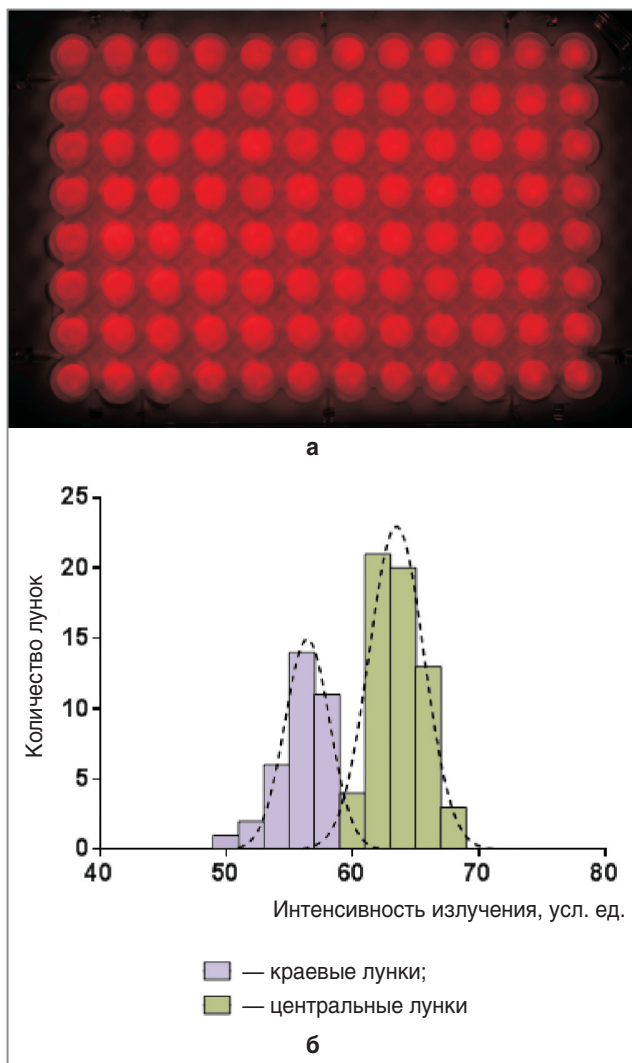


Рис. 3. Распределение интенсивности излучения по площади планшета: а — фотографическое изображение дна планшета, полученное через лист рассеивателя, закрепленный на дне планшета перед камерой; б — гистограмма распределения интенсивности излучения, усредненной по площади лунки планшета. Пунктирные линии соответствуют аппроксимации нормальным распределением

коном, при этом относительное стандартное отклонение, характеризующее разброс значений, в обоих случаях не превышает $4\text{--}5\%$.

Влияние излучения единичного светодиодного кластера на соседние лунки планшета. Конструкция излучателя предусматривает независимое включение/выключение 24 кластеров по 4 светодиода в каждом. Это обеспечивает возможность независимого облучения соответствующих групп лунок. В биологическом эксперименте при неизменной плотности мощности излучения доза облучения для разных групп лунок может быть изменена за счет времени работы соответствующих им светодиодов. В связи с этим было изучено влияние излучения единичного светодиодного кластера на соседние

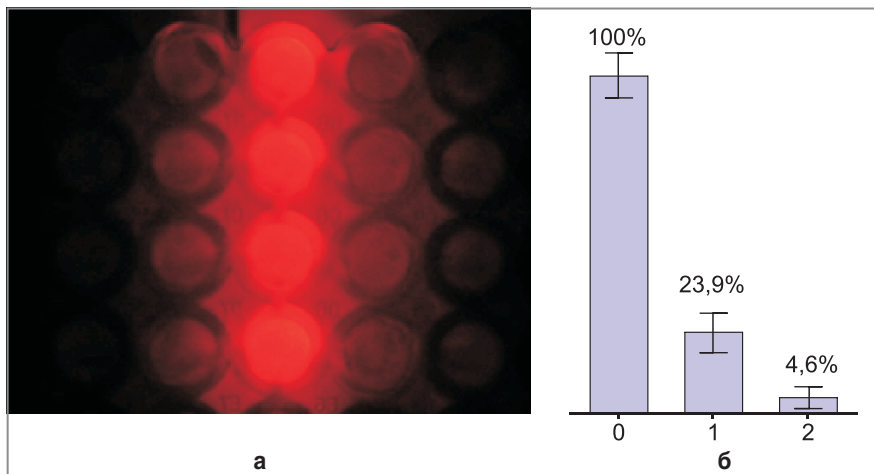


Рис. 4. Влияние излучения единичного светодиодного кластера на соседние лунки планшета: а — фотографическое изображение участка планшета, освещенного светодиодным кластером; б — распределение интенсивности излучения по центральному (0) и соседним (1 и 2) рядам лунок. Приведены средние значения и стандартное отклонение

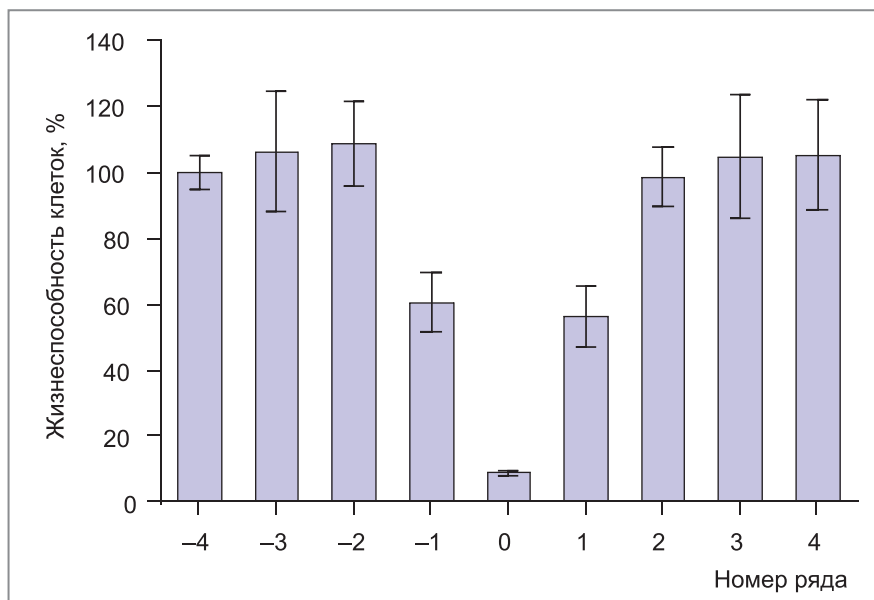


Рис. 5. Жизнеспособность клеток линии А-431, предынкубированных с препаратом Фотосенс®, в зависимости от расстояния до освещенного ряда лунок; МТТ-тест; доза облучения — 15 Дж/см²

лунки планшета. Установлено, что часть излучения, попадающая в соседний ряд лунок, составляет до 25% излучения в «целевых» лунках (рис. 4). Часть излучения, попадающая в следующий, еще более удаленный, ряд, не превышает 4–5%.

Влияние на засветку соседних лунок при включении светодиодного кластера проверено на модельной биологической системе: лунки планшета были засеяны клетками линии А-431 и предынкубированы с препаратом Фотосенс® в концентрации 10⁻⁵ моль/л. При освещении планшета использовали только один ряд диодов (два кластера, расположенных в одну

линию). Доза излучения, проходящая через дно лунок, расположенных непосредственно под светодиодами, составила 15 Дж/см² при плотности мощности 20 мВт/см² (рис. 5).

В результате облучения жизнеспособность клеток в лунках под светодиодами составила не более 10% от контроля. Существенное изменение наблюдалось и в соседних рядах лунок (на рис. 5 обозначены как «-1» и «1»). При выбранной концентрации фотосенсибилизатора и дозе падающего излучения жизнеспособность в этих лунках составила всего 50–60% от необлученного варианта. В то же время никакого биологически значимого влияния индивидуального включенного ряда светодиодов на лунки, расположенные через 1 ряд и далее, не наблюдалось. Таким образом, при облучении клеточной культуры в 96-луночном планшете (12 рядов лунок) возможно выделение нескольких независимых групп лунок и обработка их различными дозами света.

Для исследования зависимости жизнеспособности клеток линии Т24, предынкубированных с препаратом Фотосенс® (10⁻⁵ моль/л), от дозы излучения были проведены два эксперимента, в первом из которых облучение разными дозами осуществляли для клеток, высаженных на разные планшеты, а во втором — для клеток, высаженных в параллельные ряды лунок на одном и том же планшете (рис. 6). Во всех слу-

чаях плотность мощности излучения составляла 20 мВт/см², а дозу излучения варьировали за счет времени работы светодиодов. В случае использования одного планшета разные дозы излучения получали путем последовательного включения светодиодных кластеров: чем большую дозу необходимо было набрать, тем раньше включали соответствующий кластер, при этом выключение всей установки производили одновременно. Хорошее совпадение данных, полученных с помощью различных подходов к постановке эксперимента, показывает, что использование независимого включения/выключения

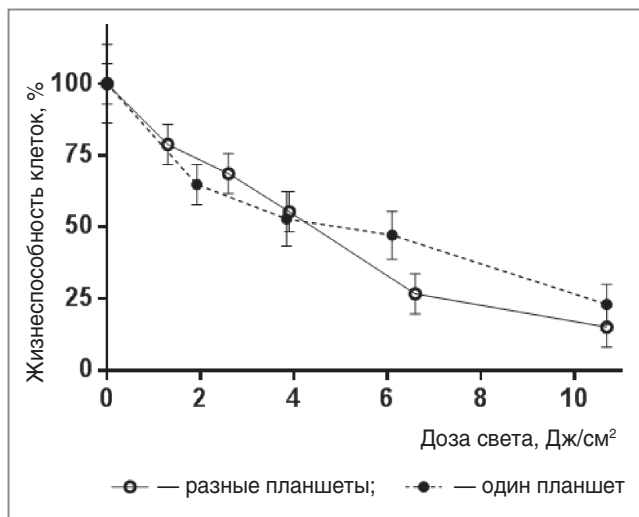


Рис. 6. Фотоиндуцированная активность препарата Фотосенс® в отношении культуры клеток T24 в зависимости от дозы света

кластеров светодиодов позволяет существенно сократить общее время эксперимента без какого-либо значимого влияния на результат исследования.

Оценка световой активности полимерных наночастиц, допированных флюорофором порфиразиновой природы. Созданная установка была использована при исследовании световой активности наночастиц на основе полимерных щеток, допированных тетра(4-фторфенил)тетрацианопорфиразином — Pz [27].

Клетки линии A-431 инкубировали в среде с исследуемыми наночастицами (10 и 40 мкмоль/л Pz) в течение 24 ч, после чего проводили облучение с использованием светодиодных матриц 590 и 625 нм (доза облучения — 10 Дж/см²). Облучение приводило к дозозависимому снижению жизнеспособности клеток (рис. 7), при этом отношение фракции ответивших (погибших) клеток при облучении на длинах волн 625 и 590 нм составило около 1,5, что свидетельствует о большей эффективности красного (625 нм) излучения в индукции фотодинамического ответа, опосредованного Pz.

Обсуждение. Практические успехи фотодинамической терапии наряду с выявлением недостатков существующих фотосенсибилизаторов привели к активному поиску новых препаратов с высокой эффективностью и минимальными побочными эффектами. При этом, несмотря на высокую исследовательскую активность (по данным ресурса PubMed, количество публикаций по данной тематике ежегодно увеличивается), оборудование, предназначенное для скрининга потенциальных препаратов и исследования их световой активности, остается крайне разнородным.

Созданный нами источник со сменными свето-

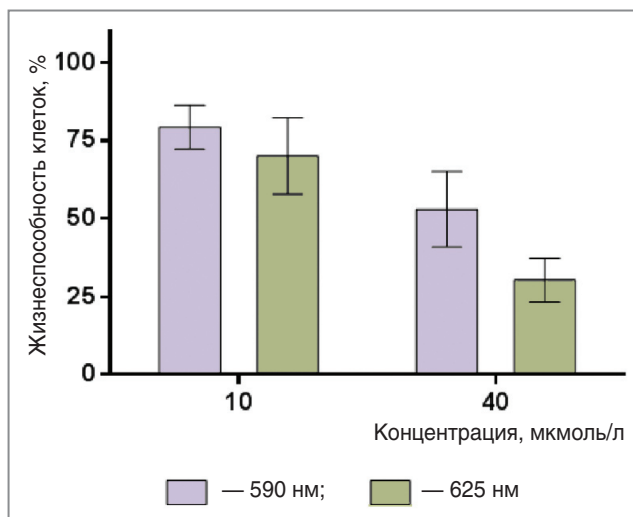


Рис. 7. Жизнеспособность клеток линии A-431, предынкубированных с наночастицами, допированными Pz (10 и 40 мкмоль/л Pz) и облученными на длине волны 590 и 625 нм; доза облучения — 10 Дж/см²

диодными матрицами с узкополосным излучением обеспечивает эффективное и производительное облучение многолуночных планшетов. Доступный спектральный диапазон определяется номенклатурой светодиодов, представленных на рынке (в красной области спектра, наиболее интересной с точки зрения фотодинамического воздействия, — до 675 нм). Использование в конструкции современных малогабаритных светодиодов повышенной мощности со встроенной в корпус оптикой позволило реализовать равномерное распределение интенсивности излучения как в пределах площади каждой лунки, так и по всей площади центральной и периферийной частей стандартного 96-луночного культурального планшета. Кроме этого, узкая диаграмма направленности и высокая мощность использованных светодиодов позволили расположить сменные светодиодные матрицы излучателя со стороны крышки облучаемого планшета и использовать устройство совместно со стандартными термостатами для многолуночных планшетов. Разработанная геометрия позволяет обеспечить прецизионный контроль температурного режима во время проведения исследований. Этот фактор в совокупности с существенно большими полученными нами интенсивностями излучения выгодно отличает описываемое устройство от наиболее близкого аналога [20], в котором светодиодная матрица располагается непосредственно под дном планшета. Максимальные интенсивности излучения, представленные в работе [20] для источников с центральными длинами волн 620 и 625 нм без использования дополнительной внешней фокусирующей оптики, составили соответственно 10,2 и 44,1 мВт/см², что в несколько раз меньше интенсивностей, достигнутых с помощью созданного нами светодиодного

излучателя (до 30 мВт/см² — в спектральном диапазоне 590 нм и до 90 мВт/см² — в диапазоне 625 нм).

Проведенные измерения степени влияния излучения единичного светодиодного кластера на соседние лунки планшета подтверждены экспериментом, выполненным на модельной биологической системе. Полученные результаты показывают, что влияние включенных светодиодов на лунки, расположенные через 1 ряд от источника излучения, пренебрежимо мало, что позволяет предложить схему независимого экспонирования групп лунок различными дозами путем независимого включения/отключения соответствующих им кластеров светодиодной матрицы. Экспериментальная апробация в биологическом эксперименте с использованием препарата Фотосенс® показала отсутствие биологически значимого влияния включенного ряда светодиодов на лунки, расположенные далее чем через 1 ряд.

Для снижения затрат времени на тестирование световой активности потенциальных фотосенсибилизаторов представляется важным иметь возможность в одном эксперименте (параллельно на одном планшете) оценить влияние различных световых доз. Одно из подобных решений было представлено в 2003 г. в работе [15], где излучение галогеновой лампы отфильтровывалось до относительно небольшой (620–700 нм) спектральной ширины и фокусировалось на торец пучка из оптических волокон, которые служили для направленной доставки излучения к целевым лункам планшета. Однако использование такой схемы представляется затруднительным по ряду причин. Основное, что отмечают и сами авторы, — это заведомо неравномерная запитка оптических волокон вследствие неоднородности пучка света на торце волоконного жгута. Такое положение приводит к существенному разбросу значений световой мощности, падающей на отдельные лунки. С другой стороны, в данной конфигурации оказывается невозможным изменение величины световой мощности, падающей на индивидуальную лунку, как следствие, — отношение световых доз между отдельными лунками является величиной строго фиксированной.

Предусмотренное в предлагаемой нами установке независимое коммутирование индивидуальных кластеров светодиодов позволяет применять существенно более гибкую экспериментальную методику, при которой соотношение доз излучения для групп лунок задается произвольно, в зависимости от исследовательской задачи. Нами получено хорошее соответствие результатов, достигнутых при освещении клеток на одном планшете параллельно и на различных планшетах последовательно. Реализованный подход позволяет осуществлять эффективный и очень быстрый скрининг новых соединений с целью выявления наиболее перспективных из них для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Заключение. Созданный светодиодный излучатель позволяет получать равномерный световой поток в 96-луночных планшетах с прецизионным контролем температурного режима. Облучение осуществляется сменными матрицами из светодиодов с различными спектральными характеристиками. Предусмотрено независимое включение/выключение кластеров светодиодов по 4 элемента, что обеспечивает возможность параллельного облучения нескольких групп лунок стандартного 96-луночного культурального планшета различными световыми дозами. Созданная установка апробирована при исследовании световой активности препаратов для фотодинамической терапии: получена зависимость фототоксичности препарата Фотосенс® от дозы света и установлено наличие значительной световой активности для новосинтезированного флюорофора из класса порфиразинов.

Финансирование исследования. Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты №№12-04-31730, 12-04-31322, 12-04-33130, 13-04-40228-Н, 13-04-92612, 14-03-31130, 11-02-00916) и Министерства образования и науки РФ (договор №14.Z50.31.0022). Публикация частично базируется на работе, финансируемой Сколковским институтом науки и технологий (Сколтех) в рамках SkolTech/MIT Initiative (проект №203-MRA).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Н.М. Шаховой (ИПФ РАН, Нижний Новгород) за ценные идеи и обсуждения при создании установки и написании статьи, а также Л.Г. Клапшиной (ИМХ РАН, Нижний Новгород) за предоставление для исследования полимерных наночастиц, допированных порфиразиновым хромофором.

Литература

1. Mroz P., Bhaumik J., Dogutan D.K., Aly Z., Kamal Z., Khalid L., Kee H.L., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production. *Cancer Lett* 2009; 282(1): 63–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.054>.
2. Furre I.E., Shahzidi S., Luksiene Z., Moller M.T., Borgen E., Morgan J., Tkacz-Stachowska K., Nesland J.M., Peng Q. Targeting PBR by hexaminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res* 2005; 65(23): 11051–11060, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0510>.
3. Akhlynina T.V., Jans D.A., Rosenkranz A.A., Stasyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., Sobolev A.S. Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity. *J Biol Chem* 1997; 272(33): 20328–20331.
4. Krieg R.C., Messmann H., Schlottmann K., Endlicher E., Seeger S., Scholmerich J., Knuechel R. Intracellular localization

is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: *in vitro* study. *Photochem Photobiol* 2003; 78(4): 393–399, [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780393JLIACF2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780393JLIACF2.0.CO2).

5. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Kazachkina N., Pecherskih E., Yakubovskaya R., Luĳyanets E., Derkacheva V., Egret-Charlier M., Vigny P. Chelation with metal is not essential for antitumor photodynamic activity of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 2002; 75(5): 527–533, [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750527CWMINE2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750527CWMINE2.0.CO2).

6. Tong Z., Singh G., Rainbow A.J. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002; 62(19): 5528–5535.

7. Gijssens A., Derycke A., Missiaen L., De Vos D., Huwylers J., Eberle A., de Witte P. Targeting of the photocytotoxic compound AlPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated peg-liposomes. *Int J Cancer* 2002; 101(1): 78–85, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10548>.

8. Жукова О.С. Модели *in vitro* для скрининга противоопухолевых соединений различной природы. *Российский биотерапевтический журнал* 2004; 3(3): 12–18.

9. Berg K., Moan J. Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer* 1994; 59(6): 814–822.

10. Ширманова М.В., Балалаева И.В., Леканова Н.Ю., Мысягин С.А., Брилкина А.А., Клапшина Л.Г., Загайнова Е.В. Разработка нового фотосенсибилизатора на основе порфиразинового комплекса иттербия. *Биофизика* 2011; 56(6): 1117–1124.

11. Wang X., Wang P., Tong W., Liu Q. Comparison of pharmacokinetics, intracellular localizations and sonodynamic efficacy of endogenous and exogenous protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells. *Ultrasonics* 2010; 50(8): 803–810, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2010.04.004>.

12. Chan W.S., Marshall J.F., Svendsen R., Bedwell J., Hart I.R. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. *Cancer Res* 1990; 50(15): 4533–4538.

13. Juzenas P., Juzeniene A., Rotomskis R., Moan J. Spectroscopic evidence of monomeric aluminium phthalocyanine tetrasulphonate in aqueous solutions. *J Photochem Photobiol B* 2004; 75(1–2): 107–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.05.011>.

14. Sakamoto K., Ohno-Okumura E. Syntheses and functional properties of phthalocyanines. *Materials* 2009; 2(3): 1127–1179, <http://dx.doi.org/10.3390/ma2031127>.

15. Meerovich I.G., Jerdeva V.V., Meerovich G.A., Derkacheva V.M., Savitsky A.P. High-throughput screening system for the study of phototoxicity of photosensitizers *in vitro*. *SPIE Proc* 2003; 4952: 203–208, <http://dx.doi.org/10.1117/12.480277>.

16. Странадко Е.Ф., Армичев А.В., Гейниц А.В. Источники света для фотодинамической терапии. *Лазерная медицина* 2011; 15(3): 63–69.

17. Mang T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004; 1(1): 43–48.

18. Странадко Е.Ф., Яшунский Д.В., Хатунцева Е.А., Устюжанина Н.Е., Рябов М.В., Ибрагимов Т.М., Нифантьев Н.Э., Гош Р. Поиск новых фотосенсибилизаторов с длиной волны возбуждения в длинноволновой части спектра. *Лазерная медицина* 2009; 13(1): 29–34.

19. Theodossiou T., MacRobert A.J. Comparison of the photodynamic effect of exogenous photoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem Photobiol* 2002; 76(5): 530–537, [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760530COTPEO2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760530COTPEO2.0.CO2).

20. Butler M.C., Itotia P.N., Sullivan J.M. A high-throughput biophotonics instrument to screen for novel ocular photosensitizing therapeutic agents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(5): 2705–2720, <http://dx.doi.org/10.1167/iov.08-2862>.

21. Zheng G., Chen J., Stefflova K., Jarvi M., Li H., Wilson B.C. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(21): 8989–8994, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611142104>.

22. Bachor R., Shea C.R., Gillies R., Hasan T. Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(4): 1580–1584.

23. Pogue B.W., Ortel B., Chen N., Redmond R.W., Hasan T. A photobiological and photophysical-based study of phototoxicity of two chlorins. *Cancer Res* 2001; 61(2): 717–724.

24. Vroenraets M.B., Visser G.W.M., Stigter M., Oppelaar H., Snow G.B., van Dongen G.A.M.S. Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2001; 61(5): 1970–1975.

25. Song K., Li J., Li L., Zhang P., Geng F., Dong R., Yang Q., Qu X., Kong B. Intracellular metabolism, subcellular localization and phototoxicity of HMME/HB in ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2011; 31(10): 3229–3235.

26. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А. Фотодинамическая активность гибридной наноструктуры на основе поликатионного производного фуллерена и фталоцианинового красителя Фотосенс. *Доклады Академии наук* 2013; 452(4): 408–412.

27. Yakimansky A.V., Meleshko T.K., Ilgach D.M., Bauman M.A., Anan'eva T.D., Klapshina L.G., Lermontova S.A., Balalaeva I.V., Douglas W.E. Novel regular polyimide-graft-(polymethacrylic acid) brushes: synthesis and possible applications as nanocontainers of cyanoporphyrine agents for photodynamic therapy. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2013; 51(20): 4267–4281, <http://dx.doi.org/10.1002/pola.26846>.

28. Фрешни Р. Культура животных клеток. М: Бином. Лаборатория знаний. 2010. 691 с.

References

1. Mroz P., Bhaumik J., Dogutan D.K., Aly Z., Kamal Z., Khalid L., Kee H.L., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production. *Cancer Lett* 2009; 282(1): 63–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.054>.

2. Furre I.E., Shahzidi S., Luksiene Z., Moller M.T., Borgen E., Morgan J., Tkacz-Stachowska K., Nesland J.M., Peng Q. Targeting PBR by hexaminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells.

- Cancer Res* 2005; 65(23): 11051–11060, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0510>.
3. Akhlynnina T.V., Jans D.A., Rosenkranz A.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., Sobolev A.S. Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity. *J Biol Chem* 1997; 272(33): 20328–20331.
 4. Krieg R.C., Messmann H., Schlottmann K., Endlicher E., Seeger S., Scholmerich J., Knuechel R. Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem Photobiol* 2003; 78(4): 393–399, [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780393LIACF2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780393LIACF2.0.CO2).
 5. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Kazachkina N., Pecherskih E., Yakubovskaya R., Lukyanets E., Derkacheva V., Egret-Charlier M., Vigny P. Chelation with metal is not essential for antitumor photodynamic activity of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 2002; 75(5): 527–533, [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750527CWMINE2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750527CWMINE2.0.CO2).
 6. Tong Z., Singh G., Rainbow A.J. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002; 62(19): 5528–5535.
 7. Gijsens A., Derycke A., Missiaen L., De Vos D., Huwylers J., Eberle A., de Witte P. Targeting of the photocytotoxic compound ALPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated peg-liposomes. *Int J Cancer* 2002; 101(1): 78–85, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10548>.
 8. Zhukova O.S. In vitro models for screening of antitumor compounds of different nature. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* 2004; 3(3): 12–18.
 9. Berg K., Moan J. Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer* 1994; 59(6): 814–822.
 10. Shirmanova M.V., Balalaeva I.V., Lekanova N.Yu., Mysyagin S.A., Brillkina A.A., Klapshina L.G., Zagaynova E.V. Development of a new photosensitizer based on ytterbium porphyrine complex. *Biofizika* 2011; 56(6): 1117–1124.
 11. Wang X., Wang P., Tong W., Liu Q. Comparison of pharmacokinetics, intracellular localizations and sonodynamic efficacy of endogenous and exogenous protoporphyrin IX in sarcoma 180 cells. *Ultrasonics* 2010; 50(8): 803–810, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2010.04.004>.
 12. Chan W.S., Marshall J.F., Svensen R., Bedwell J., Hart I.R. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. *Cancer Res* 1990; 50(15): 4533–4538.
 13. Juzenas P., Juzeniene A., Rotomskis R., Moan J. Spectroscopic evidence of monomeric aluminium phthalocyanine tetrasulphonate in aqueous solutions. *J Photochem Photobiol B* 2004; 75(1–2): 107–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.05.011>.
 14. Sakamoto K., Ohno-Okumura E. Syntheses and functional properties of phthalocyanines. *Materials* 2009; 2(3): 1127–1179, <http://dx.doi.org/10.3390/ma2031127>.
 15. Meerovich I.G., Jerdeva V.V., Meerovich G.A., Derkacheva V.M., Savitsky A.P. High-throughput screening system for the study of phototoxicity of photosensitizers in vitro. *SPIE Proc* 2003; 4952: 203–208, <http://dx.doi.org/10.1117/12.480277>.
 16. Stranadko E.F., Armichev A.V., Geynits A.V. Light sources for photodynamic therapy. *Lazernaya meditsina* 2011; 15(3): 63–69.
 17. Mang T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004; 1(1): 43–48.
 18. Stranadko E.F., Yashunskiy D.V., Khatuntseva E.A., Ustyuzhanina N.E., Ryabov M.V., Ibragimov T.M., Nifant'ev N.E., Gosh R. Looking for new photosensitizers with excitation wavelength in a long-wavelength spectrum. *Lazernaya meditsina* 2009; 13(1): 29–34.
 19. Theodossiou T., MacRobert A.J. Comparison of the photodynamic effect of exogenous photoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem Photobiol* 2002; 76(5): 530–537, [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760530COTPEO2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760530COTPEO2.0.CO2).
 20. Butler M.C., Itotia P.N., Sullivan J.M. A high-throughput biophotonics instrument to screen for novel ocular photosensitizing therapeutic agents. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(5): 2705–2720, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-2862>.
 21. Zheng G., Chen J., Stefflova K., Jarvi M., Li H., Wilson B.C. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(21): 8989–8994, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611142104>.
 22. Bachor R., Shea C.R., Gillies R., Hasan T. Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(4): 1580–1584.
 23. Pogue B.W., Ortel B., Chen N., Redmond R.W., Hasan T. A photobiological and photophysical-based study of phototoxicity of two chlorins. *Cancer Res* 2001; 61(2): 717–724.
 24. Vrouenraets M.B., Visser G.W.M., Stigter M., Oppelaar H., Snow G.B., van Dongen G.A.M.S. Targeting of aluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate by use of internalizing monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2001; 61(5): 1970–1975.
 25. Song K., Li J., Li L., Zhang P., Geng F., Dong R., Yang Q., Qu X., Kong B. Intracellular metabolism, subcellular localization and phototoxicity of HMME/HB in ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2011; 31(10): 3229–3235.
 26. Kotel'nikov A.I., Rybkin A.Yu., Goryachev N.S., Belik A.Yu., Kornev A.B., Troshin P.A. Photodynamic activity of hybrid nanostructure based on polycationic derivative of fullerene and phthalocyanine dye Photosense. *Doklady Akademii nauk* 2013; 452(4): 408–412.
 27. Yakimansky A.V., Meleshko T.K., Ilgach D.M., Bauman M.A., Anan'eva T.D., Klapshina L.G., Lermontova S.A., Balalaeva I.V., Douglas W.E. Novel regular polyimide-graft-(polymethacrylic acid) brushes: synthesis and possible applications as nanocontainers of cyanoporphyrine agents for photodynamic therapy. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2013; 51(20): 4267–4281, <http://dx.doi.org/10.1002/pola.26846>.
 28. Freshni R. *Kultura zhivotnykh kletok* [Living cell culture]. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy; 2010. 691 p.