

УДК 535.37:(547.979.733+667.211.43)

АУТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ СЕЛЕКТИВНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА РАКОВЫХ КЛЕТОК ИЗЛУЧЕНИЕМ ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

В.Ю. ПЛАВСКИЙ, Л.Г. ПЛАВСКАЯ, О.Н. ДУДИНОВА, А.И. ТРЕТЬЯКОВА,
А.В. МИКУЛИЧ, А.Н. СОБЧУК, Р.К. НАГОРНЫЙ, Т.С. АНАНИЧ, А.Д. СВЕЧКО,
Н.Д. ПРОКОПЕНКО, С.В. ЯКИМЧУК, И.А. ЛЕУСЕНКО

Институт физики НАН Беларуси (г. Минск, Республика Беларусь)

Аннотация. Показана способность низкоинтенсивного излучения видимой области спектра оказывать ингибирующее действие на раковые и нетрансформированные клетки в условиях *in vitro*. Отмечается отсутствие принципиальных различий в действии монохроматического лазерного и квазимонохроматического излучения светодиодных источников близких длин волн. Показано, что наблюдаемые фотобиологические эффекты обусловлены фотохимическими процессами с участием активных форм кислорода, генерируемых за счет возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов, и прежде всего свободных оснований порфиринов и их цинковых комплексов. Установлено, что раковые клетки характеризуются повышенной чувствительностью к действию света сине-зеленой области спектра и это обусловлено более высокой концентрацией в них эндогенных порфириновых сенсибилизаторов по сравнению с нормальными нетрансформированными клетками. Определяющая роль порфиринов подтверждена регистрацией их флуоресценции в живых клетках, а также спектральной зависимостью выживаемости клеток и зависимостью интенсивности светоиндуцированной хемилюминесценции суспензии клеток от длины волны воздействующего излучения.

Ключевые слова: раковые клетки, нетрансформированные клетки, эндогенные фотосенсибилизаторы, порфирин, флаavin, лазер, светодиод, флуоресценция, хемилюминесценция, метаболическая активность, синглетный кислород

AUTOSENSITIZED SELECTIVE INHIBITION OF CANCER CELL GROWTH BY VISIBLE LIGHT

VITALY YU. PLAVSKII, LUDMILA G. PLAVSKAYA, OLGA N. DUDINOVA,
ANTONINA I. TRETYAKOVA, ALIAKSANDR V. MIKULICH, ANDREI N. SOBCHUK,
RAMAN K. NAHORNY, TATSIANA S. ANANICH, ALEXEI D. SVECHKO,
NIKA D. PROKOPENKO, SERGEY V. YAKIMCHUK, IHAR A. LEUSENKA

Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (Minsk, Republic of Belarus)

Abstract. The ability of low-intensity visible spectrum radiation to exert an inhibitory effect on cancer and non-transformed cells *in vitro* is demonstrated. The absence of fundamental differences in the action of monochromatic laser and quasi-monochromatic LED radiation of close wavelengths is noted. It is shown that the observed photobiological effects are stipulated by photochemical processes involving active oxygen species generated with endogenous photosensitizers excitation, and, primarily, free porphyrin bases and their zinc complexes. It is established that cancer cells are characterized by increased sensitivity to blue-green spectrum light, and this is due to a higher concentration of endogenous porphyrin sensitizers in them in comparison to normal non-transformed cells. The leading role of porphyrins is confirmed by their fluorescence registration in living cells, as well as by the spectral dependence of cell survival and the dependence of the intensity of light-induced chemiluminescence of cells suspension on the exposed radiation wavelength.

Keywords: cancer cells, non-transformed cells, endogenous photosensitizers, porphyrin, flavin, laser, light-emitting diode, fluorescence, chemiluminescence, metabolic activity, singlet oxygen

Введение

В настоящее время способность оптического излучения синей области спектра (длина волны 400-485 нм) низкой интенсивности (плотность мощности 0.5-100 мВт/см²) оказывать

влияние в условиях *in vitro* на функциональные характеристики как нормальных нетрансформированных, так и раковых клеток не вызывает сомнения [1-3]. Характерно что в исследованиях, в которых проводилось сравнение действия света одинаковых спектрально-энергетических параметров на раковые и нетрансформированные клетки, отмечается наличие выраженных различий в их реакции на воздействие указанного физического фактора [1–3]. Эти различия проявляются в более высокой степени фотоингибирования метаболической активности и пролиферации раковых клеток, а также в более высоких уровнях светоиндуцированного образования активных форм кислорода (АФК). При этом причины повышенной чувствительности раковых клеток к действию синего света остаются не выясненными. По нашему мнению, осложняющим фактором в решении данного вопроса является отсутствие полного понимания механизмов фотофизических и фотохимических процессов, определяющих эффекты фотобиомодуляции, инициированные воздействием синего света. По-прежнему наименее изученным и наиболее дискутируемым остается вопрос о первичных молекулах–акцепторах, ответственных за регуляторное действие указанного физического фактора.

Цель настоящей работы – обоснование важной роли эндогенных порфиринов в сенсбилизации фотобиологических процессов в раковых и нормальных клетках при воздействии на их суспензию синего света и выяснение роли указанных тетрапирролов в проявлении повышенной чувствительности раковых клеток при действии синего света.

Методика проведения эксперимента

В качестве объектов исследования выбраны клетки эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa, а также нетрансформированные (неопухолевые) клетки почки зеленой африканской мартышки BGM. Монослой клеток выращивали в одноразовых чашках Петри диаметром 35 мм на этой же питательной среде при 37° С и 5%-м содержанием CO₂ в инкубаторе. Через 48 ч после посева монослой клеток подвергали воздействию синего света, используя полупроводниковые GaN–лазеры с длиной волны излучения $\lambda = 405$ нм и $\lambda = 445$ нм. После облучения клетки помещали на 24 ч в CO₂–инкубатор, в котором обеспечивалось поддержание температуры при 37 °С и 5% содержание CO₂. Аналогичные манипуляции (за исключением облучения) выполняли с контрольными монослоями клеток.

Оценку биологического действия оптического излучения проводили фотокolorиметрически с помощью МТТ-теста [1]. Для выяснения вклада активных форм кислорода в фотобиологические эффекты, инициируемые воздействием на клетки синего света, использовали хемилюминесцентные методы [1]. Для доказательства присутствия эндогенных порфиринов в клетках проводили регистрацию их флуоресценции как в живых клетках, так и в их экстрактах. Как известно, флуоресценцию эндогенных порфиринов в суспензии животных клеток весьма сложно детектировать вследствие преобладающей люминесценции флавинов и флавопротеинов, что обусловлено их более высокой концентрацией (превышающей концентрацию порфиринов примерно на 2–3 порядка) и более высоким (в 5-10 раз) квантовым выходом флуоресценции [1, 4]. Надежнее флуоресценция свободных оснований порфиринов и их цинковых комплексов регистрируется после экстрагирования тетрапирролов из клеток с помощью 3 М соляной кислоты. При выполнении сравнительных исследований порфириновой флуоресценции кислотных экстрактов клеток HeLa и BGM их исходная концентрация в физрастворе контролировалась либо с помощью гемоцитометра, либо с помощью проточного цитофлуориметра и подгонялась путем соответствующего разбавления физраствором до одинакового значения $5 \cdot 10^5$ мл⁻¹ для каждого типа клеток.

Измерения спектров поглощения осуществляли на спектрофотометре Cary-500 ScanUV-Vis-NIR (Varian, USA, Australia), а спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции – на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Inc., France).

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что воздействие на клетки различных типов (клетки почки зеленой африканской мартышки BGM, клетки эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa)

лазерного излучения синей области спектра с длиной волны $\lambda = 405$ нм или 445 нм плотностью мощности $I = 25$ мВт/см² в диапазоне энергетических доз $D = 1-15$ Дж/см² приводит к ингибированию их метаболической активности, контролируемой через 24 ч после прекращения облучения. Полученные результаты представлены на рис. 1, а, б.

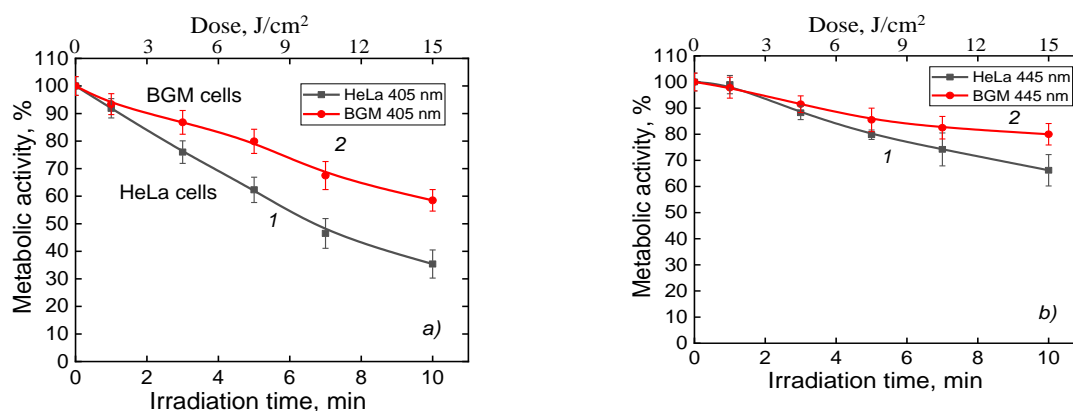


Рис. 1. Дозовые зависимости метаболической активности клеток HeLa (1) BGM (2) в процентах к контролю через 24 ч после воздействия лазерного излучения плотностью мощности $I = 25$ мВт/см² с длиной волны $\lambda = 405$ нм (а), $\lambda = 445$ нм (б).

Из рисунка следует, что по мере увеличения энергетической дозы светового воздействия наблюдается увеличение степени ингибирования метаболической активности как раковых клеток HeLa, так и нормальных BGM клеток. Однако при одинаковой энергетической дозе ингибирующее действие для излучения с длиной волны $\lambda = 405$ нм достоверно выше в отношении клеток HeLa (рис. 1, а, кривая 1), чем в отношении BGM клеток (рис. 1, а, кривая 2). Более высокая чувствительность раковых клеток (рис. 1, б, кривая 1) по сравнению с нормальными (рис. 1, б, кривая 2) регистрируется и при воздействии излучения с длиной волны $\lambda = 445$ нм. Характерно также, что после воздействия излучения $\lambda = 405$ нм скорость ингибирования метаболической активности клеток выше, чем после воздействия излучения $\lambda = 445$ нм. Указанная закономерность проявляется как для раковых, так и для нормальных нетрансформированных клеток. Установлено также, что принципиальные различия в действии лазерных и светодиодных источников близких длин волн отсутствуют [1].

Как уже отмечалось, влияние излучения синей области спектра на эффективность генерации активных форм кислорода в раковых и нормальных нетрансформированных клетках исследовалось с помощью хемилюминесцентного метода. Кинетические кривые изменения во времени интенсивности хемилюминесценции (в относительных единицах) суспензии клеток HeLa (варианты А, В) и BGM (варианты С, D) в физрастворе при ее регистрации в течение 5 минут в случае использования контрольных (необлученных) образцов клеток (варианты А и С), а также образцов, предварительно подвергнутых воздействию излучения (варианты В, D) $\lambda = 405$ нм, плотностью мощности $I = 50$ мВт/см², в течение $t = 180$ с (энергетическая доза $D = 9,0$ Дж/см²) представлены на рис. 2. Концентрация клеток HeLa и BGM составляла $2 \cdot 10^6$ мл⁻¹.

Главный вывод, который следует из кинетических кривых затухания интенсивности хемилюминесценции облученных образцов суспензий клеток, состоит в том, что при одинаковой концентрации в суспензии раковых клеток HeLa (вариант В) и нетрансформированных клеток BGM (вариант D) интегральная интенсивность сигнала (светосумма хемилюминесценции) достоверно выше в случае предварительного воздействия света на раковые клетки. Поскольку наличие сигнала хемилюминесценции в результате воздействия света объясняется протеканием фотохимических реакций с участием АФК различных типов, то полученные результаты свидетельствуют о более высоких уровнях светоиндуцированного образования АФК в раковых клетках HeLa по сравнению с нормальными клетками BGM.

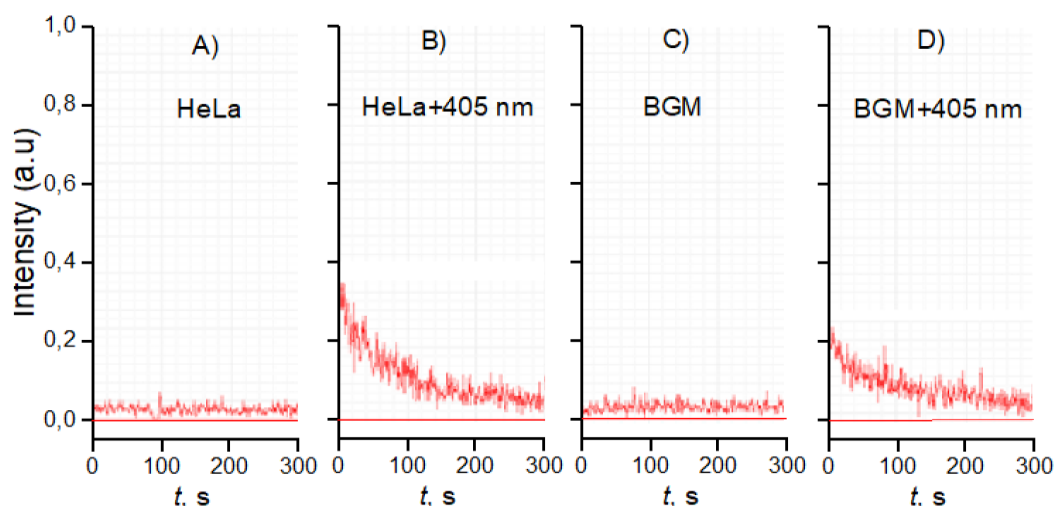


Рис. 2. Кинетические кривые изменения интенсивности хемилуминесценции суспензии клеток HeLa (A, B) и BGM (C, D) концентрацией 2×10^6 мл⁻¹ в физрастворе: A и C – контрольные суспензии клеток, не подвергавшиеся воздействию оптического излучения; B и D – суспензии клеток после воздействия лазерного излучения с длиной волны $\lambda = 405$ nm, плотностью мощности $I = 50$ мВт/см², в течение $t = 180$ с (энергетическая доза $D = 9,0$ Дж/см²).

Выполненные исследования позволили установить наличие в раковых клетках по крайней мере двух типов флуорофоров, имеющих выраженное поглощение в видимой области спектра и способных к генерации активных форм кислорода. Один вид указанных соединений имеет флавиновую природу, другой – порфириновую. В пользу данного вывода свидетельствуют данные, представленные на рис. 3.

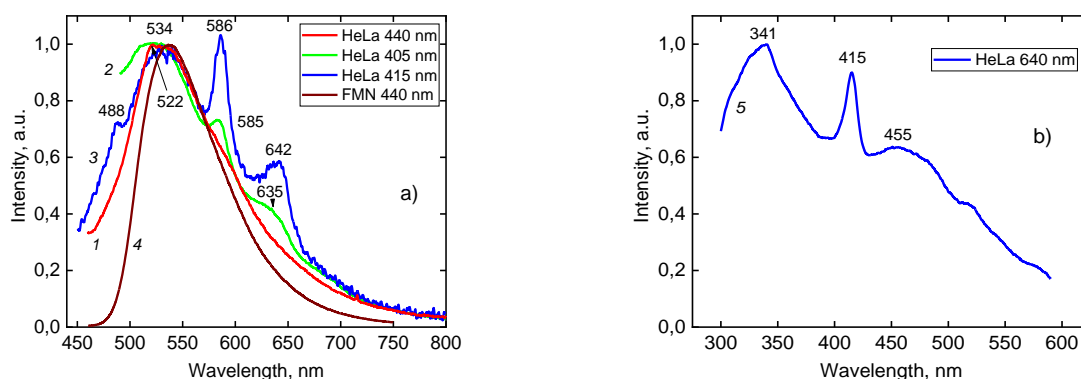


Рис. 3. Спектры флуоресценции (a) и возбуждения флуоресценции (b) суспензии в физрастворе живых клеток HeLa (1-3, 5) и FMN (3). Длина волны возбуждения: 440 (1), 405 (2), 415 нм (3, 4); длина волны регистрации 640 нм (5)

Как видно из рис. 3, a, при возбуждении светом с $\lambda_{ex} = 405, 415$ и 440 нм в суспензии живых клеток регистрируется флуоресценция с выраженным максимумом в области 534 нм, обусловленным испусканием света флавиновой компонентой. Причем, при возбуждении флуоресценции излучением $\lambda_{ex} = 440$ нм (рис. 3, кривая 1), соответствующим длинноволновому максимуму спектра поглощения флавинов, в регистрируемом спектре отсутствуют полосы, принадлежащие другим соединениям. Такого же вида спектры флуоресценции регистрируются и при $\lambda_{ex} = 450$ и 460 нм (на рисунке 1 не показаны). Однако, при возбуждении $\lambda_{ex} = 405$ нм (рис. 3, кривая 2) и особенно при $\lambda_{ex} = 415$ нм (кривая 3) на длинноволновом склоне полосы флавиновой флуоресценции регистрируется два максимума в области 585 нм и 635 – 640 нм, а также слабовыраженное плечо в области 680 нм, которое наиболее проявляется при $\lambda_{ex} = 405$ нм (рис. 3, кривая 2). Отметим, что слабовыраженные максимумы в области 522 нм при $\lambda_{ex} =$

440 нм (кривая 1) и в области 488 при $\lambda_{ex} = 415$ нм (кривая 3) обусловлены романовским рассеянием света физраствором суспензии.

Для выяснения причин повышенной фоточувствительности раковых клеток к действию синего света нами выполнены сравнительные оценки относительных концентраций эндогенных порфиринов в раковых и нормальных клетках методом флуоресцентного анализа. Вследствие низкой концентрации эндогенных порфиринов в клетках (на уровне ~ 1 нМ), низкого квантового выхода их флуоресценции ($\phi_{фл} = 0.01-0.08$ [4]), а также вследствие высокой концентрации в клетках флавинов (0.3–1 мкМ) [1] и более высокого квантового выхода их флуоресценции ($\phi_{фл} = 0.08-0.26$ [4]), а также вследствие перекрытия спектров поглощения порфириновых и флавиновых фотосенсибилизаторов, регистрация порфириновой флуоресценции в живых клетках сопряжена со значительными трудностями. Более надежно флуоресценция эндогенных порфиринов регистрируется в кислотных экстрактах клеток [1]. В качестве примера на рис. 4 показаны спектры флуоресценции (кривые 1 и 2) при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 405$ нм и возбуждения флуоресценции (кривые 4 и 5) при длине волны регистрации $\lambda_{em} = 656$ нм кислотных экстрактов раковых клеток HeLa (кривые 1 и 4) и нормальных нетрансформированных клеток BGM (кривые 2 и 5). Здесь же приведены спектры флуоресценции (кривая 3) и возбуждения флуоресценции (кривая 6) экстрагента (3 М соляной кислоты).

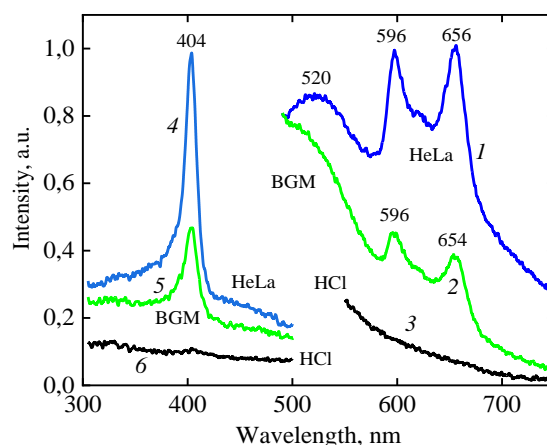


Рис. 4. Спектры флуоресценции (1–3) и возбуждения флуоресценции (4–6) экстрактов клеток HeLa (1, 4), BGM (2, 5) и экстрагента – 3 М соляной кислоты (3, 6) при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 405$ нм (1–3) и длине волны регистрации $\lambda_{em} = 656$ нм (4–6). Концентрация клеток для экстрагирования $5 \cdot 10^5$ мл⁻¹.

Из представленных данных видно, что при возбуждении флуоресценции излучением с $\lambda_{ex} = 405$ нм спектр испускания кислотных экстрактов клеток характеризуется полосой с выраженным максимумом в области $\lambda_{max} = 520$ нм, обусловленной флуоресценцией присутствующих в исследуемых кислотных экстрактах флавиновых соединений и, прежде всего, рибофлавина [4]. На длинноволновом склоне полосы флуоресценции флавинов четко регистрируется двугорбая полоса с максимумами при $\lambda_{max} = 596$ и 656 нм, характерная для флуоресценции порфириновых соединений. Как показано было ранее [4], для экстрактов клеток HeLa в 3М HCl указанная флуоресценция наиболее близка к флуоресценции химически чистого протопорфирина IX в указанном растворителе.

В спектре возбуждения флуоресценции клеточных экстрактов при использовании в качестве экстрагента 3М HCl и длине волны регистрации флуоресценции $\lambda_{em} = 656$ нм четко регистрируется узкая полоса с максимумом при $\lambda_{max} = 404$ нм, характерным для химически чистого протопорфирина IX в соляной кислоте [4]. Сравнение спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции экстрактов клеток HeLa (кривые 1 и 4) и BGM (кривые 2 и 5) показывает, что качественно они весьма схожи. Однако интенсивность сигнала порфириновой флуоресценции для опухолевых клеток HeLa примерно в 2.5 раза выше, чем для нормальных клеток BGM. Такая же количественная закономерность прослеживается при анализе спектров

возбуждения флуоресценции указанных типов клеток. Поскольку интенсивность флуоресценции прямопропорциональна концентрации флуоресцирующих молекул, можно сделать вывод, что концентрация эндогенных порфиринов в раковых клетках HeLa примерно в 2.5 раза выше, чем в нормальных нетрансформированных клетках BGM.

Заключение

Исследования, выполненные в настоящей работе, показали важную роль эндогенных порфиринов (свободных оснований и их цинковых комплексов) в генерации в клетках активных форм кислорода (и, прежде всего, синглетного кислорода), способных, изменяя редокс-состояние клеток при поглощении синего света, влиять на протекающие в них метаболические процессы. Показано, что определяющая роль порфиринов в эффектах сенсibilизации клеток проявляется, несмотря на более высокие, по крайней мере, на два порядка, концентрации флавинов (рибофлавина, FMN, FAD) в клетках.

Ведущая роль порфиринов, а не флавинов, в фотобиологических процессах, определяющих метаболизм клетки при воздействии синего света, подтверждается более высокой скоростью ингибирования метаболической активности клеток и более высокими уровнями образования АФК, регистрируемыми с помощью хемилюминесцентного метода, при воздействии на суспензию клеток излучения с $\lambda = 405$ нм по сравнению с $\lambda = 445$ нм. При этом излучение с длиной волны $\lambda = 405$ нм соответствует максимуму спектра поглощения протопорфирина IX и локальному минимуму спектра поглощения флавинов, а излучение с $\lambda = 445$ нм соответствует максимуму спектра поглощения флавинов и области локального минимума спектра поглощения порфиринов.

Впервые показано, что одной из причин повышенной чувствительности раковых клеток по сравнению с нормальными к действию синего света является более высокая концентрация содержащихся в них эндогенных порфириновых сенсibilизаторов, что подтверждено методами флуоресцентного анализа. В пользу определяющей роли порфиринов в различии реакций раковых и нормальных клеток на воздействие синего света на их суспензию свидетельствуют также более высокие уровни образования АФК и более высокая скорость светоиндуцированного ингибирования метаболической активности раковых клеток HeLa по сравнению с нормальными клетками BGM.

Список литературы

1. Plavskii V.Y., Plavskaya L.G., Dudinova O.N., Tretyakova A.I., Mikulich A.V., Sobchuk A.N., Nahorny R.K., Ananich T.S., Svechko A.D., Yakimchuk S.V., Leusenko I.A.. Endogenous photoacceptors sensitizing photobiological reactions in somatic cells. *J Appl Spectrosc.* 2023; 90 (2): 334–345.
2. Chen Z, Huang S, Liu M. The review of the light parameters and mechanisms of photobiomodulation on melanoma cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2022; 38(1): 3–11.
3. Yang J., Fu Q., Jiang H., Li Y. Liu M. Progress of phototherapy for osteosarcoma and application prospect of blue light photobiomodulation therapy. *Front. Oncol.* 2022; 12:1022973. doi: 10.3389/fonc.2022.1022973.
4. Plavskii V.Y., Sobchuk A.N., Mikulich A.V., Dudinova O.N., Plavskaya L.G., Tretyakova A.I., Nahorny R.K., Ananich T.S., Svechko A.D., Yakimchuk S.V., Leusenska I.A. Identification by methods of steady-state and kinetic spectrofluorimetry of endogenous porphyrins and flavins sensitizing the formation of reactive oxygen species in cancer cells. *Photochem Photobiol.* 2024; 100(5):1310-1327.