

Идентификация эндогенных порфиринов в раковых клетках с использованием методов стационарной и кинетической спектрофлуориметрии

В. Ю. Плавский, А. Н. Собчук, А. В. Микулич, О. Н. Дудинова,
Л. Г. Плавская, А. И. Третьякова, Р. К. Нагорный, Т. С. Ананич,
А. Д. Свечко, С. В. Якимчук, И. А. Леусенко

Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by

Разработаны методы регистрации флуоресценции эндогенных порфиринов в живых раковых клетках эпителиоидной карциномы шейки матки *HeLa*, а также спектральные методы идентификации свободных оснований порфиринов и их цинковых комплексов в экстрактах клеток. Показано, что надежной регистрации порфириновой флуоресценции и идентификации эндогенных порфириновых сенсibilizаторов препятствует интенсивная флуоресценция флавинов, обусловленная их высокой концентрацией и более высоким (по сравнению с тетрапирролами) квантовым выходом флуоресценции.

Ключевые слова: эндогенные порфирины; копропорфирин; уропорфирин; протопорфирин; раковые клетки *HeLa*; флуоресценция; синглетный кислород; фотобиомодуляция.

Identification of endogenous porphyrins in cancer cells using steady-state and kinetic spectrofluorimetry methods

V. Y. Plavskii, A. N. Sobchuk, A. V. Mikulich, O. N. Dudinova, L. G. Plavskaya,
A. I. Tretyakova, R. K. Nahorny, T. S. Ananich, A. D. Svechko,
S. V. Yakimchuk, I. A. Leusenko

B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: v.plavskii@ifanbel.bas-net.by

Methods for recording the fluorescence of endogenous porphyrins in living cancer cells of cervical epithelioid carcinoma *HeLa* have been developed, as well as spectral methods for identifying free porphyrin bases and their zinc complexes in cell extracts. It has been shown that the intense fluorescence of flavins, stipulated by their high concentration and higher (compared to tetrapyrroles) fluorescence quantum yield, prevents the reliable porphyrin fluorescence registration and endogenous porphyrin sensitizers identification.

Keywords: endogenous porphyrins; coproporphyrin; uroporphyrin; protoporphyrin; *HeLa* cancer cells; fluorescence; singlet oxygen; photobiomodulation.

Введение

В последние годы появились убедительные доказательства способности низкоинтенсивного оптического излучения видимой области спектра влиять на метаболические процессы в опухолевых и соматических клетках [1, 2]. Считается [2–6], что одной из причин изменения метаболизма в клетках под действием света является повышение уровня активных форм кислорода (АФК): синглетного

кислорода, перекиси водорода, супероксиданионрадикала, гидроксильных радикалов и др., что может приводить к изменению редокс-состояния клеток.

Несмотря на определенные успехи в изучении фотохимических механизмов регуляторного действия излучения видимой области спектра на опухолевые клетки, многие вопросы данной проблематики еще далеки от понимания. Наиболее дискутируемым остается вопрос о молекулах-акцепторах оптического излучения, локализованных в клетках и способных при фотовозбуждении генерировать АФК, влияющих на протекание метаболических процессов в клетках. Фактически в литературе имеются лишь подтверждения участия эндогенных флавинов [7] и липофусцина [8] в эффектах фотобиомодуляции в клетках в условиях *in vitro*. Недавно в нашей лаборатории получены доказательства участия порфириновых фотосенсибилизаторов в реализации регуляторного действия света в различных типах клеток: микроорганизмов [9], сперматозоидов [3, 4], клеток крови человека [5], раковых и соматических клеток [2, 6].

Цель настоящей работы – идентификация с помощью методов стационарной и кинетической спектрофлуориметрии типа эндогенных фотосенсибилизаторов порфириновой природы, локализованных в раковых клетках и способных при поглощении света оказывать влияние на их метаболическую активность за счет генерации АФК.

1. Материалы и методы

В качестве объектов исследования выбраны клетки эпителиоидной карциномы шейки матки *HeLa*. Клетки получали в Республиканском научно-практическом центре эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (г. Минск) в виде суспензии в питательной среде Игла Дулбеко DME с 5 % эмбриональной сыворотки.

Для обнаружения и идентификации порфириновых фотосенсибилизаторов исследовались спектры аутофлуоресценции и возбуждения флуоресценции как живых клеток в физрастворе, так и их экстрактов. Измерения спектров поглощения осуществляли на спектрофотометре Cary-500 Scan UV-Vis-NIR (Varian, USA), а спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции – на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Inc., France), используя стандартные кварцевые кюветы размером 10×10×40 мм, или специально-изготовленные спектральные кюветы с длиной оптического пути 4×4 мм. Кинетику затухания флуоресценции регистрировали методом время-коррелированного счета одиночных фотонов. В качестве источника возбуждения использовался лазерный диод с максимальной интенсивностью излучения на длине волны 405 нм и длительностью импульса 45 пс.

2. Результаты и обсуждение

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. 1 и рис. 2. Как видно из рис. 1, *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 (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 рис. 1 не показаны). Однако, при возбуждении $\lambda_{ex} = 405$ нм (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 (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. Важно подчеркнуть, что зарегистрированный нами спектр флуоресценции суспензии клеток *HeLa* при $\lambda_{ex} = 440, 450$ и 460 нм соответствует спектрам флуоресценции этих же клеток, приведенным в литературных данных. При этом при других длинах волн возбуждения спектры флуоресценции в литературе не исследовались.

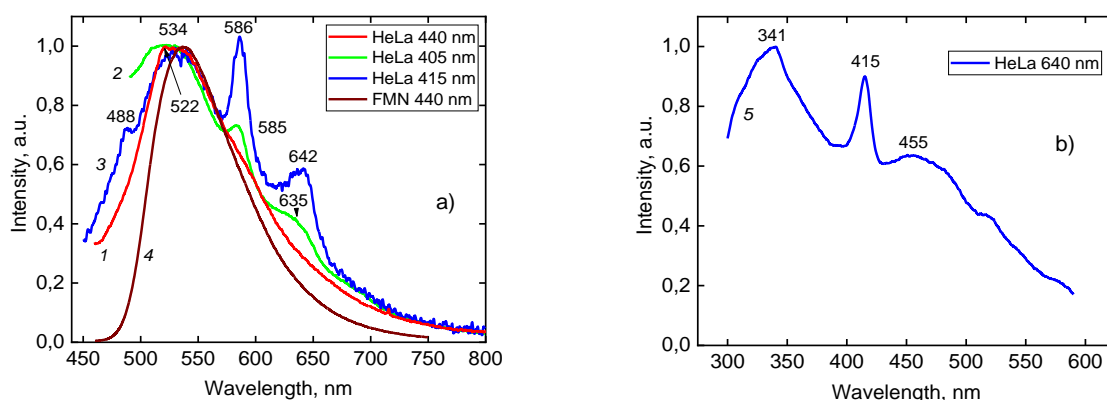


Рис. 1. Спектры флуоресценции (*a*) и возбуждения флуоресценции (*b*) суспензии в физрастворе живых клеток *HeLa* (1-3, 5) и флавиномононуклеотида (3). Длина волны возбуждения: 440 (1), 405 (2), 415 нм (3, 4); длина волны регистрации 640 нм (5)

В спектре возбуждения флуоресценции суспензии клеток при $\lambda_{em} = 640$ нм (рис. 1, *b*, кривая 5) регистрируются три выраженные полосы: при $341, 415$ и 455 нм. Скорее всего, что широкая полоса с максимумом в области 455 нм, связана с флуоресценцией свободной и связанной с белком форм флавинов. Вероятно, вклад во флуоресценцию клеток флавинов в свободной форме и в составе комплексов с белками является причиной более широких спектров флавиновой флуоресценции клеток по сравнению со спектром флуоресценции химически чистого флавиномононуклеотида (рис. 1, *b*, кривая 5). Происхождение самого коротковолнового максимума в области 341 нм в приведенном спектре возбуждения флуоресценции (рис. 1, *b*, кривая 5) обусловлено присутствием в клетках кофермента никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH) и его фосфорили-

рованной формы – (NADPH), максимумы спектров поглощения и флуоресценции которых в водных растворах расположены в области 340 и 450 нм, соответственно. Максимум в области 415 нм в спектре возбуждения флуоресценции (кривая 5) принадлежит порфириновым фотосенсибилизаторам, которые ответственны за формирование максимумов в области 585 нм, 635–640 нм на длинноволновом склоне полосы флавиновой флуоресценции (рис. 1, а, кривые 2 и 3). Одним из таких тетрапирролов может быть цинковый комплекс копропорфина III, максимумы спектра флуоресценции которого в водной среде расположены при $\lambda_{\max 1} = 582$ нм и $\lambda_{\max 2} = 635$ нм.

Более структурированные спектры флуоресценции порфириновых компонент клеток удалось получить при использовании ацетона в качестве экстрагента (рис. 2). Из рисунка видно, что при возбуждении флуоресценции экстракта клеток в полосу Soret порфиринов ($\lambda_{\text{ex}} = 405$ нм) наряду с флавиновой флуоресценцией с максимумом в области 512–527 нм в красном спектральном диапазоне регистрируется выраженный спектр с максимумами при 634 нм, 675 нм и 700 нм (кривая 1). При записи спектра возбуждения порфириновой компоненты экстракта (кривая 2, длина волны регистрации $\lambda_{\text{em}} = 700$ нм) в нем хорошо регистрируется полоса Soret с максимумом области 403 нм и слабовыраженные Q-полосы с максимумами при 503 и 537 нм. Отметим, что самая длинноволновая Q-полоса в спектре возбуждения флуоресценции экстракта при $\lambda_{\text{max}} = 632$ нм практически не регистрируется, а полоса в области $\lambda_{\text{max}} = 578$ нм не проявляется из-за интенсивного романовского рассеяния света растворителем в данной области при регистрации флуоресценции $\lambda_{\text{em}} = 700$ нм. Об определяющем вкладе романовского рассеяния в регистрируемый сигнал в области $\lambda_{\text{max}} = 578$ нм свидетельствует его наличие и при регистрации спектра для чистого ацетона (кривая 5, $\lambda_{\text{em}} = 700$ нм).

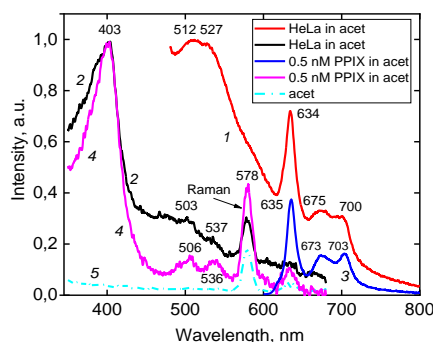


Рис. 2. Спектры флуоресценции при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 405$ нм (1, 3) и возбуждения флуоресценции при длине волны регистрации $\lambda_{\text{em}} = 700$ нм (2, 4, 5) ацетонового экстракта клеток *HeLa* (1, 2), 0.5 нМ протопорфина IX (3, 4), и экстрагента (ацетона) (5)

Сопоставление спектров порфириновой флуоресценции и возбуждения флуоресценции ацетоновых экстрактов клеток *HeLa* и спектрально-флуоресцентных характеристик химически чистых безметалльных порфиринов позволяет заключить, что одним из таких препаратов, локализованных в клетках, является протопорфин IX. Сравнение интенсивности максимума в области 634 нм в спектре флуоресценции экстракта с соответствующей интенсивностью максимума химически

чистого протопорфирина IX позволяет оценить концентрацию указанного тетрапиррола в клетках на уровне ~ 0.5 нМ.

Повышение аналитических возможностей идентификации (с помощью флуоресцентных методов) порфиринов, локализованных в клетках, достигнуто за счет их экстрагирования, применяя в качестве экстрагента 3 М соляную кислоту. Показано разнонаправленное действие HCl на флуоресценцию флавинов и порфиринов: после кислотной обработки интенсивность флуоресценции флавинмононуклеотида снижалась в 64 раза, а протопорфирина IX увеличивалась в 24 раза.

Дополнительная информация, важная для идентификации эндогенных хромофоров, получена с использованием методов кинетической спектрофлуориметрии. Показано, что длинная компонента кинетической кривой затухания для ацетонового экстракта клеток HeLa составляе $\tau = 11.05$, что наиболее близко к длительности затухания флуоресценции протопорфирина IX.

Заключение

Используя совокупность методов стационарной и кинетической спекрофлуориметрии, а также сопоставляя флуоресценцию живых клеток и их экстрактов с флуоресценцией химически чистых тетрапирролов, установлено присутствие в клетках *HeLa* протопорфирина IX, копропорфирина III, уропорфирина III, и их цинковых комплексов, характеризующихся в мономерной форме высокой эффективностью генерации синглетного кислорода.

Библиографические ссылки

1. Chen Z. The review of the light parameters and mechanisms of photobiomodulation on melanoma cells / Z. Chen, S. Huang, M. Liu // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2022. Vol. 38, iss.1. P. 3–11.
2. Endogenous photoacceptors sensitizing photobiological reactions in somatic cells / V. Y. Plavskii [et al.] // *J. Appl. Spectrosc.* 2023. Vol.90. P.334–345.
3. Comparative effect of low-intensity laser radiation in green and red spectral regions on functional characteristics of sturgeon sperm / V. Plavskii [et al.] // *Photochem. Photobiol.* 2020. Vol.96, iss.6. P.1294-1313.
4. Effect of continuous wave, quasi-continuous wave and pulsed laser radiation on functional characteristics of fish spermatozoa / V. Y. Plavskii [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 2021. Vol.216. P. 112112.
5. *Kruchenok J. V. Bilirubin- and Blue-Green Light-Induced Damage of Human Erythrocytes / J. V. Kruchenok, O. N. Dudinova, V. Y. Plavskii // Journal of Biomedical Photonics & Engineering.* 2023. P. 020303.
6. The role of porphyrins as theranostic agents during the exposure of biological systems to low-level optical radiation / V. Yu. Plavskii [et al.] // *Trends Photochem. Photobiol.* 2022. Vol.21. P.1–14.
7. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells / M. Eichler, [et al.] // *Lasers Surg. Med.* 2005. Vol.37. P. 314–319.
8. The phototoxicity action spectra of visible light in HaCaT keratinocytes / P. N. Tonolli [et al.] // *J. Photochem. Photobiology. B: Biol.* 2023. P. 112703.
9. Porphyrins and flavins as endogenous acceptors of optical radiation of blue spectral region determining photoinactivation of microbial cells / V. Y. Plavskii [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2018. Vol. 183. P.172–183.