

## Особенности метаболизма эндогенных порфиринов в раковых клетках, влияющие на эффекты фотобиомодуляции

В. Ю. Плавский, А. Н. Собчук, А. В. Микулич, А. И. Третьякова,  
Л. Г. Плавская, Р. К. Нагорный, О. Н. Дудинова, 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](mailto:v.plavskii@ifanbel.bas-net.by)*

С использованием спектрально-флуоресцентных методов показано, что концентрация эндогенных порфиринов в раковых клетках *HeLa* в условиях *in vitro* примерно в 2.5 раза выше, чем в нормальных нетрансформированных клетках почки зеленой африканской мартышки BGM. При одинаковой энергетической дозе ингибирующий эффект синего света более выражен по отношению к опухолевым клеткам. Показано, что в процессе роста опухолевые клетки экскретируют в ростовую среду порфириновые компоненты, изначально отсутствующие в ней. Предполагается, что экскреция эндогенных порфириновых фотосенсибилизаторов в среду обитания может быть причиной их повышенной концентрации в раковых опухолях.

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

## Features of endogenous porphyrins metabolism in cancer cells influencing the effects of photobiomodulation

V. Y. Plavskii, A. N. Sobchuk, A. V. Mikulich, A. I. Tretyakova, L. G. Plavskaya,  
R. K. Nahorny, O. N. Dudinova, 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](mailto:v.plavskii@ifanbel.bas-net.by)*

With spectral-fluorescent methods it has been shown, that the concentration of endogenous porphyrins in *HeLa* cancer cells under *in vitro* conditions is approximately 2.5 times higher than in normal untransformed cells of the African green monkey kidney BGM. At the same energy dose, the inhibitory effect of blue light is more pronounced in relation to tumor cells. It has been shown, that within the growth, tumor cells excrete porphyrin components that were initially absent in it into the growth medium. It is assumed that the excretion of endogenous porphyrin photosensitizers into the habitat may be the reason for their increased concentration in cancerous tumors.

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

### Введение

В настоящее время получены убедительные доказательства важной роли эндогенных порфириновых фотосенсибилизаторов в реализации эффектов фотобиомодуляции, инициированных воздействием на различные типы клеток излучения видимой области спектра [1–6]. При этом особый интерес вызывают

исследования фотоинактивации раковых клеток без внесения внешних (экзогенных) фотосенсибилизаторов. Получены первые положительные результаты, выполненные как при лечении опухолей у человека, так и у экспериментальных животных. Однако механизмы, определяющие селективность фотодеструкции раковых опухолей при воздействии света в отсутствие экзогенных фотосенсибилизаторов, далеки от понимания.

Цель настоящей работы – выяснение причин, определяющих более высокую чувствительность раковых клеток (по сравнению с нормальными нетрансформированными) к действию синего света в условиях *in vitro*, и изучение фотохимических механизмов, определяющих эффекты фотоинактивации.

## 1. Материалы и методы

В качестве объектов исследования выбраны клетки эпителиоидной карциномы шейки матки *HeLa* и клетки почки зеленой африканской мартышки BGM. 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 экстрактов клеток в 3 М соляной кислоте. Измерения спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции проводились 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. Метаболическую активность клеток оценивали с помощью фотокolorиметрического МТТ-теста [1].

## 2. Результаты и обсуждение

Выполненные исследования (рис. 1) показали способность излучения лазерных и светодиодных источников с длиной волны в области 405–465 нм, диапазоне энергетических доз 1–15 Дж/см<sup>2</sup> влиять на метаболическую активность раковых (клетки эпителиоидной карциномы шейки матки *HeLa*) и нормальных нетрансформированных клеток (клетки почек зеленой африканской мартышки BGM). Показано отсутствие принципиальных различий в биологическом действии монохроматического излучения лазерных источников и квазимонохроматического излучения светодиодов одинаковой длины волны (405 нм или 445 нм). Наиболее выраженное влияние на метаболическую активность клеток оказывает излучение с длиной волны 405 нм. Фотобиологический эффект, инициируемый воздействием излучения с  $\lambda = 445$  нм, значительно ниже; излучение с  $\lambda = 465$  нм оказывает наименее выраженный эффект. В зависимости от интенсивности излучения и энергетической дозы свет синей области спектра может как стимулировать метаболическую активность клеток (что наблюдается в довольно узком диапазоне энергетических доз), так и подавлять ее. Более того, ингибирующий эффект усиливается с увеличением энергетической дозы светового воздействия.

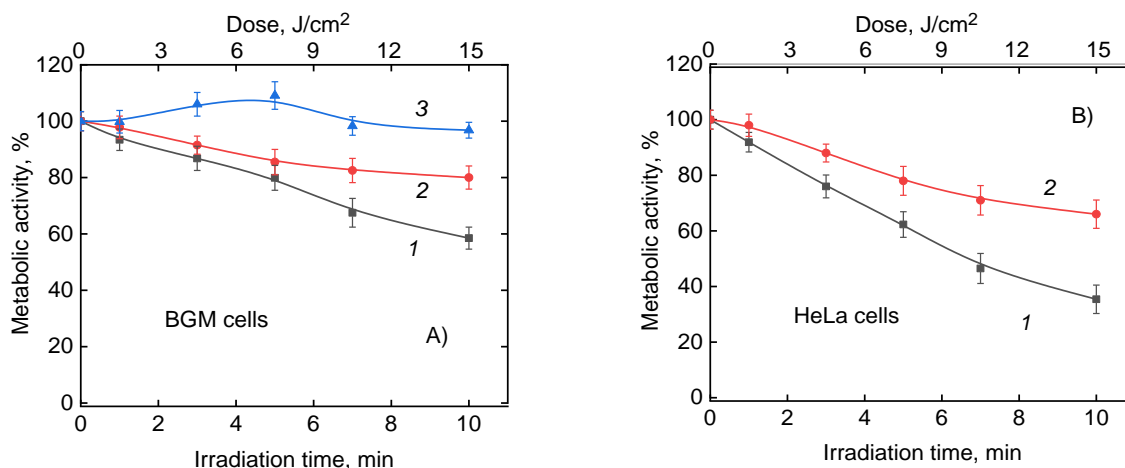


Рис. 1. Дозовые зависимости метаболической активности клеток BGM (A) и HeLa (B) в процентах к контролю через 24 ч после воздействия синего света плотностью мощности  $I = 25 \text{ мВт/см}^2$  с длиной волны  $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ нм}$  (1),  $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ нм}$  (2) и  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ нм}$  (3). На нижней оси отложено время облучения монослоя клеток в минутах, на верхней оси – доза воздействующего излучения в Дж/см<sup>2</sup>

Основной вывод, который следует из проведенных исследований, заключается в том, что при одинаковой дозе энергии ингибирующий эффект синего света значительно более выражен по отношению к опухолевым клеткам, чем по отношению к нормальным нетрансформированным.

Установлено, что биологический эффект синего света обусловлен реакциями, инициируемыми АФК вследствие возбуждения эндогенных фотосенсибилизаторов. Добавление тушителей АФК в питательную среду клеток перед их облучением может блокировать фотобиологический эффект. Впервые показано, что вклад различных типов АФК (синглетный кислород, перекись водорода и т. д.) в эффекты инактивации клеток зависит от времени после прекращения облучения, что связано с запуском волны массивной вторичной продукции АФК в клетках, и, прежде всего, перекиси водорода [1, 5]. Если сразу после прекращения облучения основным интермедиатом, определяющим ход фотобиологических реакций в клетках, является синглетный кислород, то через сутки после прекращения облучения – перекись водорода.

При низких энергетических дозах светового воздействия снижение метаболической активности клеток объясняется не их гибелью, а изменением продолжительности отдельных фаз клеточного цикла. Однако при высоких дозах энергии гибель клеток, реализуемая по механизму некроза и апоптоза, вносит значительный вклад в снижение метаболической активности.

С помощью методов стационарной и кинетической спектрофлуориметрии впервые зарегистрированы порфириновые компоненты в спектрах флуоресценции суспензии живых клеток, а также в их экстрактах в соляной кислоте. Для оценки относительной концентрации эндогенных порфиринов готовилась одинаковая концентрация ( $1 \cdot 10^5 \text{ мл}^{-1}$ ) суспензии клеток HeLa и BGM, выращенных в одинаковых экспериментальных условиях. Концентрацию отмытых от ростовой среды клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии. Затем клетки обрабатывали 3 М соляной кислотой в идентичных условиях, и после центрифугирования исследовали

довали спектральные характеристики супернатанта. Спектры флуоресценции (кривые 1 и 2) при длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм и возбуждения флуоресценции (кривые 4 и 5) при длине волны регистрации  $\lambda_{\text{em}} = 656$  нм супернатанта для раковых клеток HeLa (кривые 1 и 4) и нормальных нетрансформированных клеток BGM (кривые 2 и 5) представлены на рис. 2.

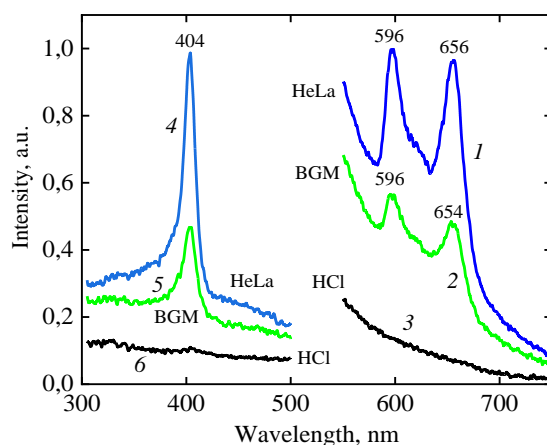


Рис. 2. Спектры флуоресценции (1–3) и возбуждения флуоресценции (4–6) экстрактов клеток HeLa (1, 4), BGM (2, 5) и экстрагента – 3 М соляной кислоты (3, 6) при длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{ex}} = 405$  нм (1–3) и длине волны регистрации  $\lambda_{\text{em}} = 656$  нм (4–6)

Видно, что уровень порфириновых фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках примерно в 2,5 раза выше, чем в нетрансформированных. Более высокая концентрация эндогенных порфиринов в раковых клетках является причиной более высокой скорости их инактивации по сравнению с нормальными клетками. На основании сравнения характеристик поглощения флавиновых и порфириновых сенсбилизаторов, а также данных хемилюминесцентного анализа и биологических эффектов излучения с  $\lambda = 405$  и 445 нм сделан вывод, что определяющий вклад в образование синглетного кислорода в клетках при воздействии излучения с  $\lambda = 405$  нм вносят эндогенные порфирины, характеризующиеся наиболее интенсивным поглощением в этой области. Вклад флавинов более выражен под действием излучения с  $\lambda = 445$  нм, соответствующего максимуму в их спектре поглощения и минимальному поглощению порфиринов.

Впервые обнаружено, что в процессе роста раковые клетки экскретируют в ростовую среду порфириновые компоненты, изначально отсутствующие в ней. Данный вывод следует из результатов, представленных на рис. 3, на котором приведены спектры флуоресценции (рис. 3, А) и возбуждения флуоресценции (рис. 3, В) ростовой среды до помещения в нее клеток *HeLa* (кривая 1) и после их двухсуточного роста (кривая 2). Причем ростовую среду после выращивания в ней клеток центрифугировали для последующего отделения надосадочной жидкости от оставшихся целых клеток и их фрагментов. Видно, что в спектре флуоресценции среды, полученной после выращивания клеток, в отличие от исходной ростовой среды, появляется плечо в области 636 нм, присутствующее и в спектре флуоресценции суспензии живых клеток *HeLa* [1]. Кроме того, в спектре возбуждения

флуоресценции среды (рис. 3, В) после выращивания клеток появился максимум в области 414 нм, регистрируемый также и в спектре возбуждения флуоресценции суспензии живых клеток, не содержащей ростовой среды [1]. Наличие указанных максимумов в флуоресцентных спектрах суспензии клеток было соотнесено с присутствием в их составе эндогенных порфиринов [1, 5].

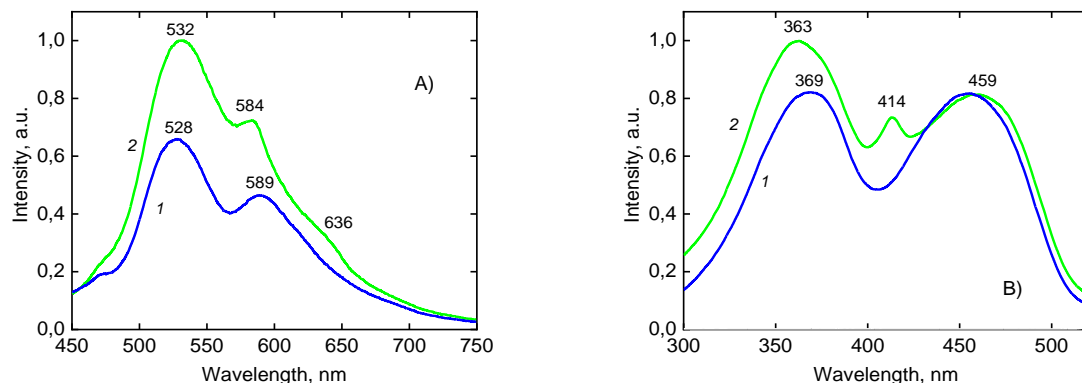


Рис. 3. Спектры флуоресценции (А) и возбуждения флуоресценции (В) ростовой среды раковых клеток *HeLa* до их выращивания (1) и после двухсуточного роста (2). Длина волны возбуждения флуоресценции  $\lambda_{ex} = 405$  нм, длина волны регистрации флуоресценции  $\lambda_{em} = 635$  нм

## Заключение

Показано, что опухолевые клетки характеризуются более высокой чувствительностью к действию синего света. Основная причина этого – более высокая концентрация эндогенных порфиринов, характеризующихся высокой эффективностью генерации синглетного кислорода. В процессе роста опухолевые клетки экскретируют в ростовую среду порфириновые компоненты, изначально отсутствующие в ней. Экскреция эндогенных порфириновых фотосенсибилизаторов в среду обитания может быть причиной их повышенной концентрации в раковых опухолях, о чем свидетельствуют многочисленные литературные данные.

## Библиографические ссылки

1. Endogenous photoacceptors sensitizing photobiological reactions in somatic cells / V. Y. Plavskii [et al.] // *J. Appl. Spectrosc.* 2023. Vol. 90. P. 334–345.
2. 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(6). P. 1294–1313.
3. 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.
4. *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.
5. 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.
6. 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.