



УДК 611.664-006.3.04:615.28(476)

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАСНОГО И СИНЕГО СПЕКТРАЛЬНЫХ ДИАПАЗОНОВ В ПРИСУТСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА «ФОТОЛОН» НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК HeLa

Церковский Д. А.¹, Александрова Е. Н.¹, Протопович Е. Л.¹, Шелкович С. Е.²,
Швец Е. В.², Литвинова Т. М.³

¹Государственное учреждение
«РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь;

³Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Актуальным направлением научных исследований в экспериментальной онкологии является изучение возможности активации фотосенсибилизирующих агентов (ФС) лазерным излучением различных спектров. Цель исследования состояла в изучении влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) красного и синего спектральных диапазонов в присутствии ФС «Фотолон» на опухолевые клетки. В условиях *in vitro* на культуре опухолевых клеток HeLa исследована жизнеспособность клеток после воздействия низкоинтенсивного (10 мВт/см²) лазерного излучения красного ($\lambda = 650$ нм) и синего ($\lambda = 405$ нм) спектров и их комбинации, как в отсутствие, так и в присутствии ФС в дозе 1 мкг/мл. Критерием оценки эффективности проведенных воздействий было количество жизнеспособных опухолевых клеток в камере Горяева. Результаты исследований показали, что НИЛИ красного и синего спектров не оказывает в отсутствие ФС существенного влияния на рост культуры опухолевых клеток HeLa. Инкубация клеток в течение 2 ч в питательной среде, содержащей ФС, приводит к увеличению чувствительности клеток к последующему лазерному излучению красного и синего спектральных диапазонов. По критерию 50%-й эффективности (длительности лазерного воздействия, вызывающего уменьшение числа клеток на 50 % по сравнению с контролем), фотодинамическая активность НИЛИ синего диапазона в 6 раз выше фотодинамической активности лазерного излучения красного диапазона. Инкубация клеток с ФС и последующее воздействие НИЛИ синего и красного спектров приводит к значительной клеточной гибели. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении противоопухолевой эффективности НИЛИ красного и синего спектров при его комбинированном применении с ФС «Фотолон».

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, фотосенсибилизатор, опухолевые клетки HeLa.

Введение. Лазерная терапия является актуальным и высокоэффективным методом лечения различных заболеваний, в том числе и злокачественных новообразований. Как правило, в клинической онкологии применяются лазерные аппараты, генерирующие излучение с высокой интенсивностью. В последние годы определенное внимание уделяется изучению эффективности низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), которое применяется в медицине в двух основных направлениях: при фотодинамической терапии опухолей, где используется его повреждающий эффект, а так-

же для лечения широкого круга различных воспалительных заболеваний, имея в виду стимулирующий эффект НИЛИ, а именно — противовоспалительный, анальгезирующий, регенераторный, десенсибилизирующий, гипохолестеринемический, бактерицидный и др.

Цель работы — изучение противоопухолевого эффекта НИЛИ двух различных спектров (красный и синий) в комбинации с применением отечественного ФС.

Материалы и методы. Культура опухолевых клеток. Исследования проводили на монослой-

ной культуре опухолевых клеток HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, клон М) [1], полученной из банка клеточных культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РНПЦ ЭМ, Республика Беларусь). Культуру клеток выращивали в питательной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина.

Культура клеток HeLa является перевиваемой разновидностью клеточных культур, когда используются стабильные штаммы клеток, пассирующиеся вне организма в течение многих лет. Перевиваемая линия карциномы шейки матки HeLa была выделена в 1952 г. [2] и до сих пор используется во многих лабораториях мира. При перевивке бестимусным мышам клетки культуры HeLa характеризуются туморогенностью с соответствующими гистологическими свойствами исходной карциномы шейки матки человека [3].

Культура клеток HeLa характеризуется эпителиоподобной морфологией и растет в виде монослоя на поверхности стеклянной или пластиковой посуды. Для снятия монослоя клеток с поверхности лабораторной посуды, подсчета числа клеток в камере Горяева и посева культуры используют раствор Версена (0,02 % ЭДТА).

Фотосенсибилизатор. В качестве ФС использовали лекарственное средство «Фотолон» (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), содержащее активное вещество хлорин e_6 в виде тринатриевой соли и вспомогательное вещество — низкомолекулярный медицинский поливинилпирролидон. ФС «Фотолон» обладает интенсивными полосами поглощения в видимой и ультрафиолетовой области. Максимумы поглощения наиболее интенсивных полос находятся в видимой области спектра при $\lambda = 402 \pm 4$ нм и при $\lambda = 660 \pm 5$ нм. Перед использованием порошок разводили физиологическим раствором до концентрации 1 мг/мл, затем в соотношении 1:50 (до концентрации 20 мкг/мл) и добавляли по 100 мкл во флаконы с культурой опухолевых клеток (объем питательной среды 2 мл) до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Фотооблучение. Фотооблучение (ФО) флаконов с опухолевыми клетками проводили с применением НИЛИ красного ($\lambda = 650$ нм) и/или синего ($\lambda = 405$ нм) спектральных диапазонов на аппарате лазерном терапевтическом «Lotos» («Люзар», Республика Беларусь) с плотностью мощности излучения 10 мВт/см². Размер светового пятна на расстоянии 10 см от излучающего модуля регулировали диафрагмой.

Оценка противоопухолевой эффективности.

Для экспериментов культуру опухолевых клеток рассеивали в пенициллиновые флаконы по 150–200 тыс. клеток в 2 мл питательной среды. На 3-е сутки после посева в экспоненциальной стадии роста культуры клеток во флаконы с монослоем клеток добавляли 100 мкл раствора (20 мкг/мл) ФС «Фотолон» в концентрации 1 мкг/мл. В контрольные флаконы добавляли 100 мкл физиологического раствора.

Флаконы, помещенные в светозащитную упаковку, инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 2 ч, затем отмывали от препарата холодным раствором Хенкса и добавляли свежую питательную среду. Через 24 ч после воздействия монослой клеток диспергировали 0,02%-м раствором Версена, добавляли в полученную взвесь клеток 0,1%-й раствор трипанового синего (1:10) и проводили подсчет живых (не окрашенных трипановым синим) клеток в камере Горяева. Выживаемость клеток в опытных группах определяли в процентах по отношению к контролю.

По кривой доза–эффект (число клеток в зависимости от концентрации препарата) определяли ЭД₅₀ — эффективную длительность светового воздействия, вызывающую уменьшение числа клеток на 50 % по сравнению с контролем.

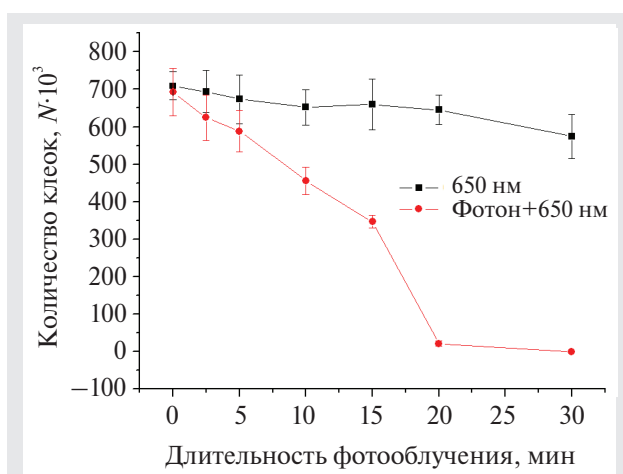
Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя программы Excel 2010, Origin Pro 7.0 и Statistica (версия 10). При уровне значимости $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение. *Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ красного спектрального диапазона без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон».* Исследовано число клеток культуры HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 650$ нм) в течение периода от 2,5 до 30 мин, без предварительной инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФС «Фотолон». Время инкубации основано на изученной ранее динамике его накопления в опухолевых клетках [4].

Полученные данные, представленные в таблице 1 и на рисунке 1, свидетельствуют о том, что НИЛИ красного спектрального диапазона без ФС «Фотолон» практически не влияет на число опухолевых клеток HeLa. Достоверное снижение жизнеспособных опухолевых клеток по сравнению с контролем наблюдается после 10, 15, 20 и 30-минутной длительности ФО.

Таблица 1 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 650$ нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

Длительность фотооблучения	Количество опухолевых клеток				p
	без ФС «Фотолон»		с ФС «Фотолон»		
	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%	
0 мин	709 ± 37	100	693 ± 63	98	0,83
2,5 мин	694 ± 56	98	624 ± 61	88	0,42
5 мин	674 ± 65	95	588 ± 55	83	0,34
10 мин	652 ± 47	92	456 ± 37	64	0,0099
15 мин	660 ± 67	93	346 ± 17	49	0,0014
20 мин	645 ± 39	91	21 ± 7	3	<0,00001
30 мин	574 ± 59	81	0	0	<0,00001


 Рисунок 1 — Число опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 650$ нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

Предварительная инкубация с ФС «Фотолон» приводит к увеличению чувствительности клеток к последующему лазерному излучению. При этом увеличение длительности ФО приводит повышению эффективности воздействия.

Так, после ФО в течение 10 мин выживаемость клеток составляет 64 %, 15 мин — 49 %, 20 мин — 3 % по сравнению с необлученным контролем. 50%-я эффективность фотодинамического воздействия наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 15 мин.

Необходимо отметить, что ФС «Фотолон» в концентрации 1 мкг/мл питательной среды сам по себе, без воздействия света, не влияет на число клеток. Темновая цитотоксичность проявляется только при концентрации ФС «Фотолон» выше 5 мкг/мл [4].

Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ синего спектрального диапазона без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон».

Исследовано число клеток культуры HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 405$ нм) в течение периода от 2,5 до 30 мин, без предварительной инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФС «Фотолон». Время инкубации основано на изученной ранее динамике накопления в опухолевых клетках [4]. Полученные в данной части экспериментального исследования результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

 Таблица 2 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 405$ нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

Длительность фотооблучения	Количество опухолевых клеток				p
	без ФС «Фотолон»		с ФС «Фотолон»		
	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%	
0 мин	815 ± 60	100	798 ± 81	98	0,87
2,5 мин	790 ± 67	97	443 ± 30	54	0,0011
5 мин	805 ± 55	99	94 ± 15	12	<0,00001
10 мин	709 ± 53	87	5 ± 3	0,6	<0,00001
15 мин	669 ± 69	82	0	0	<0,00001
20 мин	676 ± 73	83	0	0	<0,00001
30 мин	636 ± 60	78	0	0	<0,00001

Полученные данные, представленные в таблице 2 и на рисунке 2, свидетельствуют о том, что НИЛИ синего спектрального диапазона без ФС «Фотолон» обладает некоторым тормозящим действием на клеточную пролиферацию. Достоверное снижение выживаемости (на 22 %) по сравнению с контролем наблюдается после 30-минутной длительности ФО.

Предварительная инкубация с ФС «Фотолон» приводит к увеличению чувствительности клеток к последующему лазерному излучению. При этом эффективность совместного воздействия ФС «Фотолон» и синего света возрастает с увеличением длительности облучения и значительно более выражена, чем красного света. Так, после ФО в течение 2,5 мин выживаемость клеток составляет 54 %, 5 мин — 12 %, 10 мин — 0,6 % по сравнению с необлученным контролем, а облучение в течение 15 и более минут приводит к гибели всех клеток. 50%-я эффективность фотодинамического воздействия наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 2,5 мин.

ФС «Фотолон» в концентрации 1 мкг/мл питательной среды сам по себе, без воздействия света, не влияет на число клеток.

Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ двух спектральных диапазонов ($\lambda = 405$ нм, $\lambda = 650$ нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон». Исследовано число клеток культуры HeLa после воздействия НИЛИ двух спектральных диапазонов (синий с $\lambda = 405$ нм; красный с $\lambda = 650$ нм), без предварительной

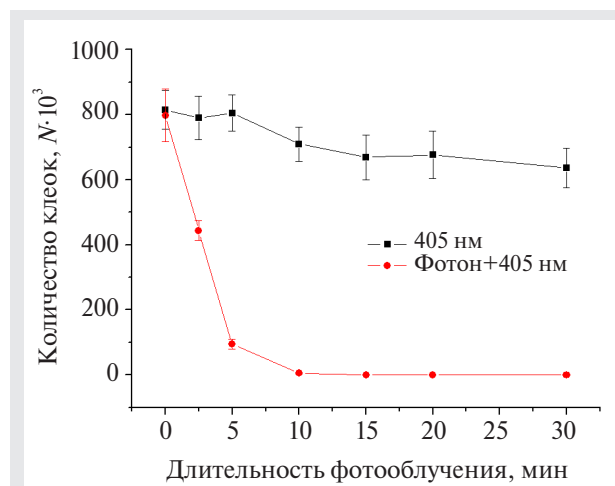


Рисунок 2 – Число опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 405$ нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФС «Фотолон». Исходя из эффективности совместного воздействия ФС «Фотолон» синего или красного света, изученной в предыдущих разделах, использовали только длительности 2,5 или 5 мин для синего света и 2,5, 5 или 10 мин — для красного света. Полученные в данной части экспериментального исследования результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 3.

Таблица 3 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ($\lambda = 405$ нм и $\lambda = 650$ нм) и/или ФС «Фотолон»

Длительность фотооблучения		Количество опухолевых клеток				p
		без ФС «Фотолон»		с ФС «Фотолон»		
405 нм	650 нм	N·10³	%	N·10³	%	
0 мин	0 мин	725 ± 80	100	651 ± 69	90	0,51
2,5 мин	0 мин	699 ± 55	96	293 ± 29	40	0,0001
5 мин	0 мин	680 ± 61	94	13 ± 6	2	<0,00001
0 мин	2,5 мин	703 ± 67	97	712 ± 47	98	0,91
0 мин	5 мин	682 ± 71	94	691 ± 67	95	0,93
0 мин	10 мин	665 ± 30	92	464 ± 29	64	0,001
2,5 мин	2,5 мин	630 ± 30	87	303 ± 33	42	0,00005
2,5 мин	5 мин	619 ± 24	85	48 ± 8	7	<0,00001
2,5 мин	10 мин	635 ± 21	88	34 ± 13	5	<0,00001
5 мин	5 мин	625 ± 22	86	10 ± 3	1	<0,00001
5 мин	10 мин	665 ± 24	92	9 ± 3	1	<0,00001

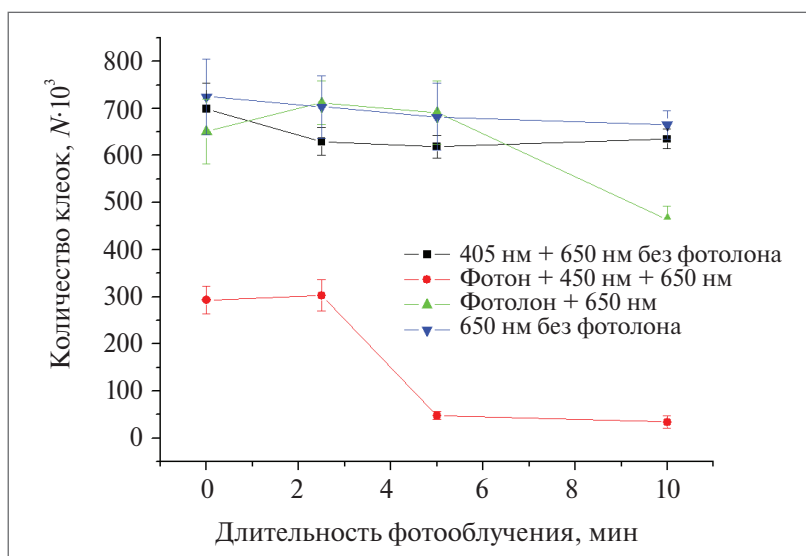


Рисунок 3 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ($\lambda = 405$ нм) и красного ($\lambda = 650$ нм), без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

Полученные данные, представленные в таблице 3 и на рисунке 3, свидетельствуют о том, что воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ($\lambda = 405$ нм) и красного ($\lambda = 650$ нм), без предварительной инкубации клеток с ФС «Фотолон», не вызывает существенного торможения роста культуры HeLa.

Инкубация клеток с ФС «Фотолон» и последующее воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ($\lambda = 405$ нм) и красного ($\lambda = 650$ нм), приводит к значительной клеточной гибели. При этом, если эффективность комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (2,5 мин)», «405 нм (5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (5 мин) + 650 нм (10 мин)» не превышает эффективность действия одного синего света, то в случае комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (10 мин)» наблюдается взаимное усиление действия синего и красного света.

Так, выживаемость клеток после действия ФС «Фотолон» и комбинации «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (5 мин)» составляет 7 %, тогда как после действия ФС «Фотолон» и света 405 нм (2,5 мин) — 40 %, а после действия ФС «Фотолон» и света 650 нм (5 мин) — 95 %.

Выживаемость клеток после действия ФС «Фотолон» и комбинации «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (10 мин)» составляет 5 %, тогда как после действия ФС «Фотолон» и света 405 нм (2,5 мин) — 40 %, а после действия ФС «Фотолон» и света 650 нм (10 мин) — 64 %.

Закключение. На культуре опухолевых клеток HeLa исследована выживаемость клеток

после ФО с применением НИЛИ ($\lambda = 650$ нм; 2,5–30 мин) без инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон» (1 мкг/мл, 2 ч). Результаты исследования показали, что НИЛИ красного спектрального диапазона в отсутствие ФС «Фотолон» не оказывает существенного влияния на рост культуры клеток. Воздействие НИЛИ красного спектрального диапазона совместно с ФС «Фотолон» приводит к снижению выживаемости клеток; эффективность воздействия возрастает с увеличением длительности ФО; 50%-я эффективность наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 15 мин.

На культуре опухолевых клеток HeLa исследована выживаемость клеток после облучения НИЛИ ($\lambda = 405$ нм; 2,5–30 мин) без инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон» (1 мкг/мл, 2 ч). Результаты исследования показали, что НИЛИ синего спектрального диапазона в отсутствие ФС «Фотолон» не оказывает значительного влияния на рост культуры клеток. Воздействие НИЛИ синего спектрального диапазона совместно с ФС «Фотолон» приводит к снижению выживаемости клеток; эффективность воздействия возрастает с увеличением длительности ФО; 50%-я эффективность наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 2,5 мин.

Воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ($\lambda = 405$ нм) и красного ($\lambda = 650$ нм), без предварительной инкубации

клеток с ФС «Фотолон» не вызывает существенного торможения роста культуры HeLa. Инкубация клеток с ФС «Фотолон» и последующее воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ($\lambda = 405$ нм) и красного ($\lambda = 650$ нм), приводит к значительной клеточной гибели. При этом, если эффективность комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (2,5 мин)», «405 нм (5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (5 мин) + 650 нм (10 мин)» не пре-

вышает эффективность действия одного синего света, то в случае комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (10 мин)» наблюдается взаимное усиление действия синего и красного света.

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении противоопухолевой эффективности НИЛИ красного и синего спектров при его комбинированном применении с ФС «Фотолон».

Список цитированных источников

1. Гусев, Л. И. Лазерная гемотерапия в клинической онкологии / Л. И. Гусев, Д. А. Притыко, Т. А. Шароев // Российский онкологический журнал. — 2013. — № 6. — С. 48–53.
2. Российская коллекция клеточных культур позвоночных [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1.pdf>. — Дата доступа: 16.06.2022.
3. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance / J. Lypez, A. Poitevin, V. Mendoza-Martinez, C. Pirez-Plasencia, A. Garcna-Carrancb // BMC Cancer. — 2012. — Vol. 12. — P. 48.
4. Комбинация цисплатина с ФДТ in vitro / Е. Н. Александрова, Е. Л. Протопович, Д. А. Церковский, Ю. П. Истомина // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 1. — С. 58.

The effect of low-intensity laser radiation in the red and blue spectral ranges in the presence of the photosensitizer photolon on the viability of HeLa tumor cells

Tzerkovsky D. A.¹, Alexandrova E. N.¹, Protopovich Ya. L.¹, Shelkovich S. E.², Shvets E. V.², Litvinova T. M.³

¹State Institution “N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus;

²State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”, Minsk, Republic of Belarus;

³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The study of the possibility of activation of photosensitizing agents (PS) by laser radiation of various spectra is a topical problem of contemporary oncology. The aim of this work was to study the effect of low-intensity laser radiation (LILR) of the red and blue spectral ranges in the presence of the PS Photolon on tumor cells. Under in vitro conditions on a culture of HeLa tumor cells, cell viability was studied after exposure to low-intensity (10 mW/cm²) laser radiation of red ($\lambda = 650$ nm) and blue ($\lambda = 405$ nm) spectra and their combination, both in the absence and in the presence of PS at a dose of 1 μ g/ml. The criterion for evaluating the effectiveness of the interventions was the number of viable tumor cells in the Goryaev's chamber. The results of the studies have shown that LILR of the red and blue spectra does not have a significant effect on the growth of the culture of HeLa tumor cells in the absence of PS. Incubation of cells for 2 h in a nutrient medium containing PS leads to an increase in the sensitivity of cells to subsequent laser radiation in the red and blue spectral range. According to the criterion of 50 % efficiency (the duration of laser exposure, causing a decrease in the number of cells by 50 % compared to the control), the photodynamic activity of LILR in the blue range is 6 times higher than the photodynamic activity of laser radiation in the red range. Incubation of cells with PS and subsequent exposure to blue and red LILR leads to significant cell death. The results obtained indicate an increase in the antitumor efficacy of LILR of the red and blue spectra when it is combined with the PS Photolon.

Keywords: low-intensity laser radiation, photosensitizer, tumor cells HeLa.

Поступила 21.07.2022