

Динамика накопления протопорфирина IX, индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой в трех клеточных линиях разного происхождения

© Д.А. Горбенко,^{1,2} А.В. Белашов,¹ Т.Н. Беляева,³ Е.С. Корнилова,^{3,4} И.К. Литвинов,³
И.В. Семенова,¹ О.С. Васютинский¹

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: daryagova7@gmail.com

Поступило в Редакцию 23 апреля 2020 г.

В окончательной редакции 2 июля 2020 г.

Принято к публикации 6 июля 2020 г.

С помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии исследована динамика синтеза и накопления протопорфирина IX, индуцированного 5-аминолевулиновой кислотой (5-ALA) в трех постоянных клеточных линиях: в immortalized клетках, полученных из опухолевых тканей человека — эпителиальной карциномы HeLa и аденокарциномы легкого A549, и фибробластоподобных immortalized клетках эмбрионов мыши 3T3. Накопление протопорфирина IX в клеточных культурах оценивалось на основе анализа интенсивности его флуоресценции. Исследована динамика изменения интенсивности флуоресценции в зависимости от времени инкубации клеток с 5-ALA и ее концентрации.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, протопорфирин IX, 5-аминолевулиновая кислота, конфокальная флуоресцентная микроскопия.

DOI: 10.21883/JTF.2021.01.50288.147-20

Фотодинамическая терапия (ФДТ) находит широкое применение в современной онкологии для лечения широкого круга злокачественных новообразований. Основой ее успешного использования является генерация активных форм кислорода с помощью фотосенсибилизаторов (ФС) — веществ синтетического и природного происхождения. Накопление ФС в клетках злокачественных опухолей и генерация ими активных форм кислорода под воздействием оптического излучения приводит к запуску механизмов клеточной гибели, причем разные дозы облучения могут приводить к преобладанию определенного механизма гибели клеток, а также к разной скорости ее протекания [1,2]. Более того, для клеток различных локализаций опухоли разные механизмы гибели могут реализовываться при существенно отличающихся дозах облучения [1]. ФС активно используют и в диагностических целях для определения локализации опухоли, трофических язв и некоторых других патологий, а также для оценки размеров повреждений и исследования их морфологии [3]. К настоящему времени разработаны и используются в клинической практике ФС разных типов: хлоролины, порфирины, фталоцианины, а также 5-аминолевулиновая кислота (5-ALA). Как известно, 5-ALA является предшественником эндогенно

образующегося протопорфирина IX (PpIX) [4], который, в свою очередь, является важным прекурсором миоглобина, цитохрома и гема [5]. Было показано, что PpIX синтезируется в митохондриях клеток и проявляет свойства фотосенсибилизатора [6,7], поэтому подробная информация о его генерации в клетках опухолей различных локализаций имеет большое значение для применения в ФДТ и диагностике.

В некоторых типах клеток и тканей скорость синтеза PpIX определяется скоростью синтеза эндогенной 5-ALA. Синтез 5-ALA регулируется механизмом контроля с обратной связью. Работу данного механизма обеспечивают определенные концентрации свободного гема. Присутствие экзогенной 5-ALA обходит механизм контроля обратной связи и, таким образом, может индуцировать внутриклеточное накопление повышенных концентраций PpIX, однако это происходит только в определенных типах клеток и тканей. Известно ([7,8]), что 5-ALA более интенсивно накапливается в опухолевой ткани, что приводит к более активной генерации PpIX. Такая тканеспецифическая фотосенсибилизация обеспечивает основу для использования 5-ALA-индуцированного PpIX для ФДТ и диагностики [9]. Поэтому представляет интерес изучение эффективности генера-

ции и аккумуляции PpIX в разных клеточных линиях, а также сравнение с его синтезом в незлокачественных клетках. Ранее механизмы генерации и внутриклеточной локализации PpIX были изучены в клеточных линиях карциномы гортани, рака печени, эмбриональной почки человека [6], глиобластомы [10], медуллобластомы [11] и рака кожи [12].

В настоящей работе проведено исследование динамики 5-ALA-индуцированного накопления PpIX в клетках трех клеточных линий: карциномы шейки матки человека (HeLa), карциномы легкого человека (A549), и фибробластоподобных иммортализованных клетках эмбрионов мыши (3T3). Выбор клеточных линий определялся разной степенью их канцерогенности. Так, наиболее канцерогенными из выбранных трех типов считаются клетки линии A549, в то время как клетки типа 3T3 являются псевдонормальными, т.е. они иммортализованы, но сохраняют свойства нормальных клеток. Необходимо отметить, что несмотря на то, что клетки HeLa и A549 — это клетки человека, а 3T3 — клетки мыши, все три клеточные линии являются стандартными моделями для цитологических исследований и позволяют проводить сопоставления.

Все клеточные образцы культивировали в чашках Петри на стеклах в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина в атмосфере 5% CO₂, 50% влажности при 37°C. Эксперименты проводили через 48 h после посева клеток при достижении 60–70% монослоя. Далее культуральную среду заменяли на среду, содержащую 5-ALA в нужной концентрации, и клетки инкубировали указанное время.

Первая часть настоящей работы была посвящена определению времени инкубации клеток в растворе, содержащем 5-ALA, приводящему к наиболее эффективной генерации PpIX. Также изучалась зависимость от концентрации 5-ALA, вносимой в культуральную среду. Клетки линии HeLa инкубировали в течение 1, 2, 3 и 4 h при четырех концентрациях 5-ALA в культуральной среде: 0, 50, 100 и 200 µg/mL. После этого клетки промывали фосфатным буфером PBS и исследовали на конфокальном флуоресцентном микроскопе Olympus FV3000. Флуоресценцию PpIX возбуждали на длине волны 405 nm и детектировали в диапазоне длин волн 610–650 nm. Для получения устойчивого сигнала от протопорфирина, квантовый выход флуоресценции которого оказывается достаточно низким по сравнению с сигналами искусственных флуорофоров, синтезированных специально для использования в флуоресцентной микроскопии, был использован максимальный коэффициент усиления ФЭУ в флуоресцентном микроскопе. При этом сравнительно низкая плотность мощности возбуждающего лазера позволила избежать быстрого повреждения клеток, вызванного фотосенсибилизированной генерацией активных форм кислорода. Для обеспечения корректного сравнения данных о накоплении PpIX в разных типах клеток, а

также при разной концентрации 5-ALA и разном времени инкубации, параметры чувствительности ФЭУ и время экспозиции поддерживались неизменными в ходе всего эксперимента. Одним из важных преимуществ конфокальной флуоресцентной микроскопии в данном случае является возможность регистрации достаточно слабого сигнала от PpIX, обусловленного незначительным квантовым выходом его флуоресценции.

Трехмерные распределения интенсивности флуоресценции PpIX регистрировались в нескольких полях в каждом образце, сканирование образцов проводилось с шагом 1 µm по оси Z. Анализ полной интенсивности флуоресценции в клетках проводился с использованием программного обеспечения ImageJ [13]. Для измерения полного сигнала флуоресценции со всей клетки производилось суммирование флуоресцентных изображений в различных поперечных сечениях, регистрируемых в конфокальном флуоресцентном микроскопе. Впоследствии производилась сегментация отдельных клеток, предполагающая выделение их примерных границ на регистрируемых изображениях, полученных в режиме „на пропускание“. Это позволяло однозначно задать выделяемые области и верно разделить смежные клетки. Для учета возможного влияния размеров отдельных клеток на интегральный сигнал флуоресценции, суммарный сигнал флуоресценции, полученный описанным выше образом, делился на площадь клетки, определяемой в ходе ее сегментации. Это позволяло определить величину средней интенсивности флуоресценции в клетке $\overline{I_{tot}}$.

Из-за возможного наличия в полученном сигнале помех, источниками которых являются в том числе темновой шум ФЭУ и флуоресценция самой питательной среды, для определения интенсивности флуоресценции, обусловленной только протопорфирином IX, накопленным внутри клеток, при каждом измерении учитывалась также средняя интенсивность фоновой области I_{bg} , в которой клетки отсутствовали. Искомая интенсивность флуоресценции PpIX (I_{PpIX}) в клетках определялась как разность полученной интегральной интенсивности флуоресценции клетки ($\overline{I_{tot}}$) и интегральной интенсивности флуоресценции фона (I_{bg}) — области внеклеточной среды такого же объема:

$$I_{int} = \overline{I_{tot}} - I_{bg}. \quad (1)$$

Полученные таким образом результаты по 50 отдельным клеткам в каждом образце анализировались статистически, определялось среднее значение интенсивности флуоресценции PpIX и его среднеквадратичное отклонение.

Интенсивность флуоресценции PpIX была проанализирована как функция времени инкубации с 5-ALA и концентрации 5-ALA. Было продемонстрировано, что максимальное накопление PpIX происходит после 3-часовой инкубации в растворе, содержащем 5-ALA в концентрации 100 µg/mL. При этом важно отметить, что увеличение концентрации 5-ALA со 100 до 200 µg/mL

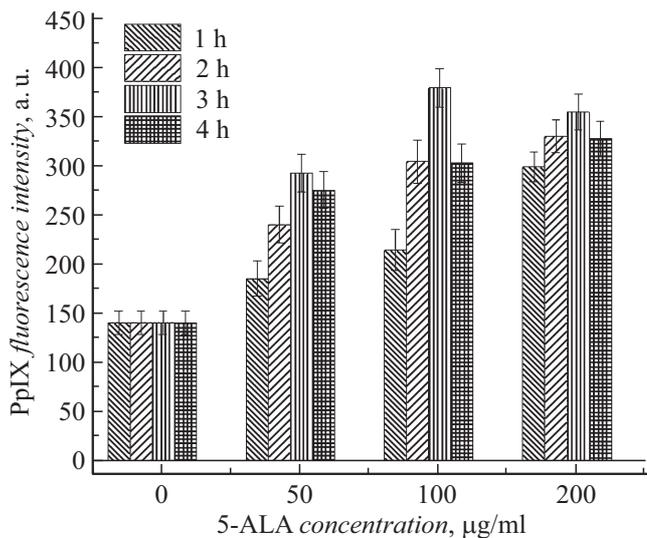


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции PpIX в клетках линии HeLa в зависимости от времени инкубации при разных концентрациях 5-ALA.

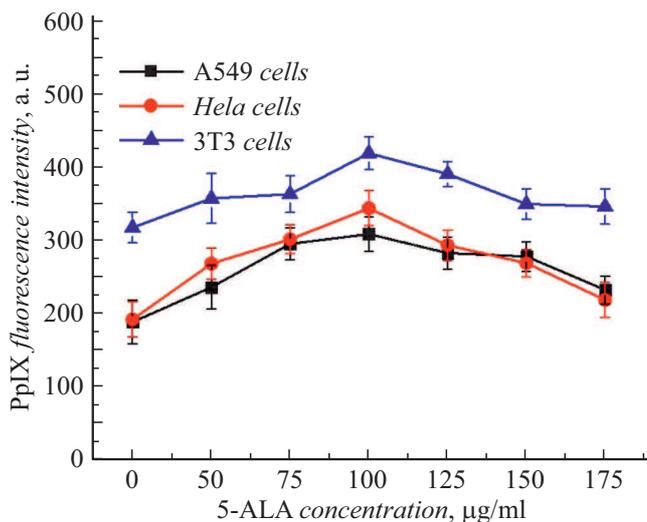


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции PpIX в исследуемых клеточных линиях как функция концентрации 5-ALA. Указанные погрешности измерений соответствуют доверительной вероятности 0,95 по Стьюденту.

при 3-часовом культивировании не вызывало увеличения флуоресценции PpIX. На рис. 1 приведены гистограммы полной интенсивности флуоресценции PpIX в клетках HeLa в зависимости от концентрации 5-ALA и длительности накопления.

Вторая часть настоящей работы была посвящена анализу эффективности накопления PpIX в разных типах клеток в зависимости от концентрации 5-ALA в культуральной среде. Клетки HeLa, A549 и 3T3 инкубировали в течение 3 h при концентрациях 5-ALA в культуральной среде 0, 50, 75, 100, 125, 150 и 175 µg/ml. Анализ

интенсивности флуоресценции производился аналогично первой серии экспериментов, количественная оценка проводилась с помощью формулы (1). На рис. 2 приведена полученная зависимость интенсивности флуоресценции PpIX от концентрации 5-ALA для трех исследуемых клеточных линий. Как видно из рис. 2, концентрации 5-ALA выше 100 µg/ml не обеспечивали увеличения накопления PpIX. Полученные зависимости накопления PpIX от концентрации 5-ALA отражают обычную кинетику ферментативного процесса, для которой характерна колоколообразная форма ([14,15]). Аналогичные зависимости были получены другими авторами для других клеточных линий ([16,17]). Также нужно принимать во внимание, что большие концентрации 5-ALA могут оказывать повреждающее действие на метаболическую активность клеток в целом. Таким образом, мы продемонстрировали, что максимальное накопление PpIX во всех трех клеточных линиях достигается при 3-часовой инкубации с 5-ALA в концентрации 100 µg/ml.

На рис. 3 приведены репрезентативные флуоресцентные изображения клеток линий A549, HeLa и 3T3, инкубированных без 5-ALA (a-c) и после 3-часовой инкубации с 5-ALA в концентрации 100 µg/ml (d-f). Как видно из рисунка, все исследуемые клеточные культуры демонстрируют флуоресцентный сигнал самостоятельно синтезированного эндогенного PpIX. Внутриклеточная локализация сигнала неоднородна и, по всей видимости, ассоциирована с определенными внутриклеточными структурами. В соответствии с литературными данными такими структурами могут быть митохондрии ([18,19]).

Из полученных данных было определено относительное увеличение сигнала интегральной флуоресценции PpIX в клетках исследуемых линий. Как видно из рис. 2, максимальное увеличение сигнала флуоресценции PpIX в иммортализованных клетках, полученных из опухолевых тканей (HeLa и A549), в сравнении с контрольными образцами без 5-ALA в культуральной среде составляет в среднем 63,2%. В иммортализованных клетках нормальных фибробластов мыши (линия 3T3) это увеличение составляет только 30%. При этом необходимо отметить, что флуоресцентный сигнал в клетках линии 3T3 в контрольных образцах в среднем в 1,7 раз выше, чем в клетках линий HeLa и A549, что говорит о более эффективном синтезе эндогенно образованного PpIX в иммортализованных клетках 3T3.

Таким образом, в результате работы были определены оптимальная концентрация 5-ALA и время инкубации клеток *in vitro*, приводящие к наиболее эффективной генерации протопорфирина IX в трех постоянных иммортализованных клеточных линиях: двух, полученных из опухолевых тканей человека, и одной, полученной из нормальных фибробластов мыши. Показано, что оптимальные концентрации 5-ALA одинаковы для клеток разного происхождения. Полученные данные позволяют предполагать, что 5-ALA-индуцированное накопление

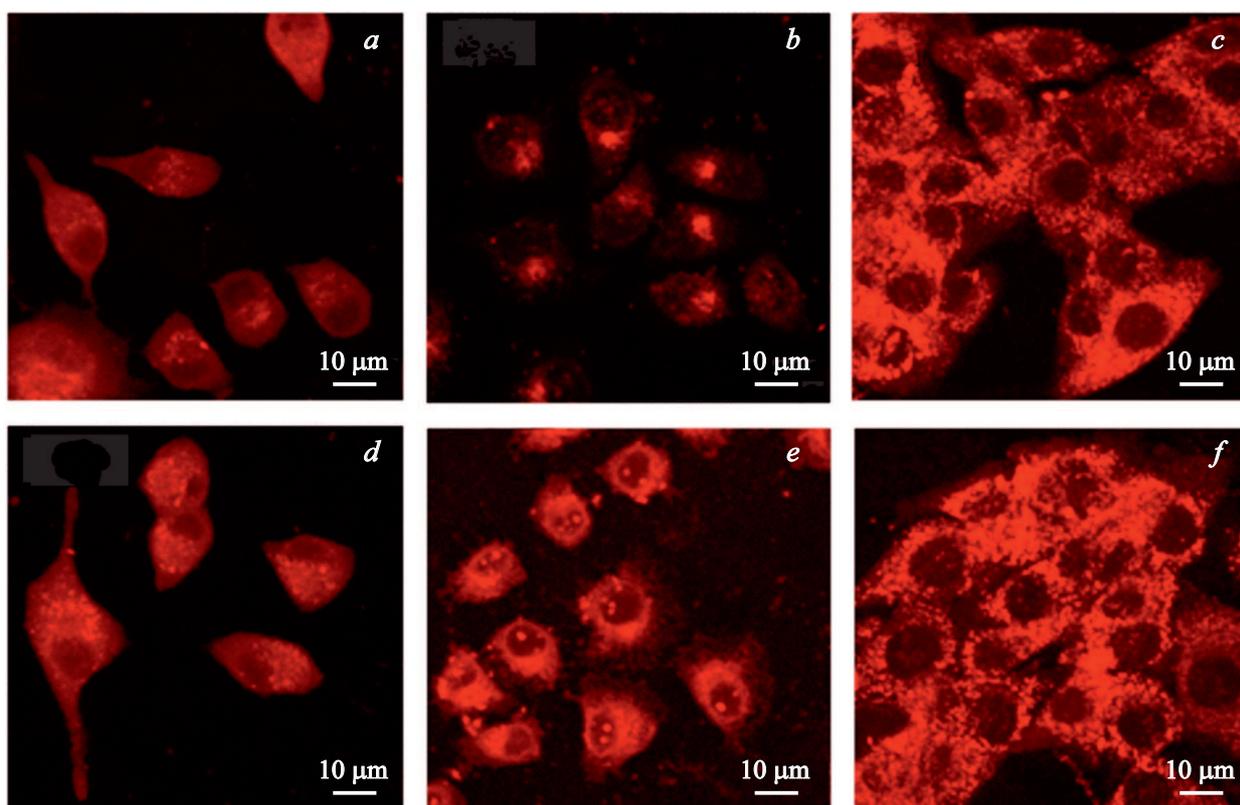


Рис. 3. Флуоресцентные изображения клеток A549 (a, d), HeLa (b, e) и 3T3 (c, f), инкубированных без 5-ALA (a–c) и после 3-часовой инкубации с 5-ALA в концентрации 100 µg/mL (d–f).

PrIX в клетках может быть связано со степенью злокачественности, однако не исключено, что этот эффект является тканеспецифичным.

Благодарности

А.В. Белашов благодарит Совет по грантам Президента Российской Федерации (Проект СП-2349.2019.4), а Т.Н. Беляева, И.К. Литвинов и Е.С. Корнилова — Министерство науки и высшего образования РФ (регистрационный номер темы АААА-А19-119020190093-9) за финансовую поддержку.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A.A. Zhikhoreva, A.V. Belashov, D.A. Gorbenko, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. *Rus. J. Phys. Chem. B*, **38** (6), 8 (2019).
- [2] D.A. Gorbenko, A.V. Belashov, T.N. Belyaeva, E.S. Kornilova, I.V. Semenova, O.S. Vasyutinskii. *JPCS*, **1236** (1), 1 (2019).
- [3] H. Abrahamse, M.R. Hamblin. *Biochem. J.*, **473** (4), 347 (2016).
- [4] J. Moan, O. Bech, J.M. Gaullier, T. Stokke, H.B. Steen, L.W. Ma, K. Berg. *Int. J. Cancer*, **75**, 134 (1998).
- [5] M. Wachowska, A. Muchowicz, M. Firczuk, M. Gabrysiak, M. Winiarska, M. Wańczyk, K. Bojarczuk, J. Golab. *Molecules*, **16**, 4140 (2011).
- [6] D.J. Piacquadio, D.M. Chen, H.F. Farber, J.F. Fowler Jr., S.D. Glazer, J.J. Goodman, L.L. Hruza, E.W. Jeffes, M.R. Ling, T.J. Phillips. *Arch Dermatol.*, **140** (1), 41 (2004).
- [7] K. Mahmoudi, K.L. Garvey, A. Bouras, G. Cramer, H. Stepp, J.G. Jesu Raj, D. Bozec, T.M. Busch, C.G. Hadjipanayis. *J. Neurooncol.* **141** (3), 595 (2019).
- [8] S. Firdousa, M. Nawaza, M. Ikram, M. Ahmed. *Biology and Medicine*, **2** (3), 626 (2012).
- [9] J.C. Kennedy, R.H. Pottier. *J. Photochem. Photobiolog. B: Biology*, **4** (4), 275 (1992).
- [10] J.E. Lawrence, A.S. Patel, R.A. Rovin, R.J. Belton, C.E. Bammert, C.J. Steele, R.J. Winn. *International Scholarly Research Notices* 2014, 405360.
- [11] A. Briel-Pumpa, T. Beez, L. Ebbert, M. Remkecke, S. Weinhold, M.C. Sabel, R.V. Sorga. *J. Photochem. Photobiolog. B: Biology*, **189**, 298 (2018).
- [12] K.R. Rollakanti, S.C. Kanick, S.C. Davis, B.W. Pogue, E.V. Maytin. *Photon. Laser. Med.*, **2** (4), 287 (2013).
- [13] P. Bankhead. *Queen's University Belfast, Manual*. (2014).
- [14] K.A. Johnson. *FEBS Lett.*, **587** (17), 2753 (2013).
- [15] D.L. Purich. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. (Elsevier, 2010), 920 p.

- [16] E. Gallegos, I. Rodríguez, L. Martínez Guzmán, A. Pérez Zapata. Archives of Medical Research, (30), 163 (1999).
- [17] J.E. Lawrence, A.S. Patel, R.A. Rovin, R.J. Belton Jr., C.E. Bammert, C.J. Steele, R.J. Winn. ISRN Surgery, **2014**, 1 (2014).
- [18] Y. Lin, H. Chang, F. Chang, C. Shen. FEBS Lett., **587**(19), 3202 (2013).
- [19] M. Sachar, K.E. Anderson, X. Ma. J Pharmacol Exp Ther., **356** (2), 267 (2016).