

О.О. Лихова
С.В. Коноваленко
О.М. Чепурна

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: рак
передміхурової залози, рак
молочної залози, клітинні
лінії, лазерне опромінення,
фотодинамічна терапія,
фотобіомодуляція, доксорубіцин.

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ПРОВЕДЕННЯ ФОТОБІОМОДУЛЯЦІЇ ТА ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ ДЛЯ КУЛЬТУР КЛІТИН РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ТА МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ

Мета: дослідити особливості впливу лазерного випромінювання різної інтенсивності на клітини ліній раку передміхурової залози (РПЗ) та раку молочної залози (РМЗ), а також оцінити можливість поєднання світлової стимуляції (фотобіомодуляції) та лікування методами фотодинамічної та хіміотерапії для синергетичної дії на пухлинні клітини. **Об'єкт і методи:** у дослідженні використані клітини ліній РПЗ різного ступеня злоякісності (LNCaP та DU-145) та РМЗ (MCF-7). Для опромінення клітин використовували випромінювання напівпровідникового лазерного приладу (Фотоніка Плюс, Україна) з довжинами хвиль 405, 445, 660, 635 та 810 нм. Потужність світлового випромінювання вимірювали за допомогою вимірювача оптичного випромінювання Ophir Optronics (США). Для клітин РПЗ в якості фотосенсибілізатора використовували 5-амінолевуленову кислоту (5-ALA) (1мМоль), РМЗ — доксорубіцин (DOX) в концентрації 1 мкг/мл. Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0. **Результати:** на клітинах ліній РПЗ (LNCaP та DU-145) встановлено, що найбільш оптимальними для отримання найвищої фотодинамічної активності 5-ALA є наступні параметри лазерного випромінювання: довжина хвиль — 405 нм, час опромінення — 10 хв, щільність потужності — 20 мВ/см². Цитотоксичний вплив DOX на клітини РМЗ (MCF-7) підвищується з використанням лазерного випромінювання з довжиною хвиль 445 нм, що співпадає з піком поглинання DOX. Додаткове використання лазерного випромінювання з довжиною хвилі 810 нм в якості фотобіомодуляції перед введенням хіміопрепарату дозволяє підвищити його загальний токсичний вплив на клітини MCF-7. **Висновки:** використання лазерного випромінювання з довжиною хвилі, що точно співпадає з піком поглинання хіміопрепаратів, дозволяє посилити їх токсичний вплив без підвищення дози та збільшення часу опромінення. Додаткове використання лазерного опромінення для фотобіомодуляції збільшує загальний токсичний вплив хіміопрепарату на пухлинні клітини.

Лазерне випромінювання може бути самостійним напрямком у лікуванні пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями із застосуванням таких методів, як лазерна термодеструкція, фотодинамічна терапія (ФДТ), а також поєднуватися з іншими відомими способами лікування з метою підсилення їх ефективності [1–3]. Зокрема, низькоінтенсивне лазерне випромінювання при використанні методу фотобіомодуляції (ФБМ) може зіграти синергетичну роль поруч із хіміотерапією за рахунок підви-

щення накопичення в малігнізованих тканинах цитостатичних препаратів та підсилення токсичності останніх. Фотобіомодуляційна терапія (ФБМТ) — метод застосування світла для зміни експресії або активності фоторецепторів ендогенних ферментів, ініціювання сигнальних шляхів, які модулюють клітинний та тканинний метаболізм, проліферацію клітин та запальну реакцію [4]. ФБМТ знайшла широке застосування в медицині для відновлення тканин, регенерації м'язів, зменшення вираженості

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

болю під час лікування ран, зниження запалення. Джерелом світла зазвичай є лазери малої потужності (500 мВт) або світлодіоди в червоній та ближній інфрачервоній (ІЧ) ділянці спектру (600–850 нм), що забезпечує ефективне проникнення світла, відсутність канцерогенних чи мутагенних ефектів та мінімальний тепловий вплив [5, 6]. У ФБМ беруть участь активні форми кисню (АФК), у невеликих кількостях вони виступають посередниками та ініціюють каскад клітинних процесів. Іншими молекулами, які задіяні у механізмах ФБМ, є аденозинтрифосфат, Ca^{2+} та NO. Зміни редокс-потенціалу, викликані ФБМ, активують редокс-чутливі фактори транскрипції, що призводить до проліферації фібробластів, синтезу колагену, модуляції запалення та антиоксидантних реакцій, посилення ангіогенезу, оксигенації та відновлення тканин. З іншого боку, лазерне випромінювання використовують і для проведення ФДТ — це метод лікування пацієнтів з онкологічними захворюваннями, заснований на взаємодії фотосенсибілізатора (ФС) зі світлом та молекулярним киснем, що виробляє в токсичній кількості АФК у тканинах-мішенях [7, 8]. Для реалізації фотодинамічного ефекту необхідна одночасна наявність трьох факторів: молекул нетоксичного барвника-ФС, лазерного світла з довжиною хвилі, що поглинається ФС, та молекулярного кисню. Молекула ФС, поглинувши квант лазерного світла, переходить у збуджений стан. Ця енергія збудження в біологічній тканині витрачається в фотореакціях двох типів. У реакціях першого типу відбувається утворення вільних радикалів, другого типу — утворення синглетного кисню. Ці АФК — синглетний кисень та вільні радикали — і є основними пошкоджувальними факторами при ФДТ [9, 10].

На сьогодні існує безліч методик проведення лазерного опромінення пухлин як з використанням ФБМ, так і для проведення ФДТ, однак, відсутні чіткий опис параметрів та залежності результату опромінення від різного морфологічного типу пухлин та ступеня їх злоякісності [11]. Окрім того, слід розглянути застосування ФБМ для підсилення ефективності хіміотерапії з використанням лазерного випромінювання з довжиною хвилі, що співпадають з вікном прозорості біологічних тканин, однак без непотрібного збудження фотохімічних агентів. Використання низькоінтенсивного лазерного опромінення (з визначеною дозою, часом опромінення і щільністю потужності з урахуванням типу пухлин та ступеня їх злоякісності) у поєднанні із хіміотерапією дозволить підвищити її ефективність і отримати прогнозовані результати лікування.

Мета роботи: дослідити особливості впливу лазерного випромінювання різної інтенсивності на клітини ліній раку передміхурової залози (РПЗ) та раку молочної залози (РМЗ), а також оцінити можливість поєднання світлової стимуляції (ФБМ) та лікування методами ФДТ та хіміотерапії для синергетичної дії на пухлинні клітини.

В експериментальному дослідженні використано лінії клітин, отримані з клітинного банку ліній із тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України. Для проведення експериментальних робіт було обрано клітини РМЗ (лінія MCF-7) та РПЗ людини різного ступеня злоякісності (LNCaP — низький ступінь туморогенності, DU-145 — середній ступінь). Клітини вирощували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням рекомбінантного людського інсуліну (0,01 мг/мл) і 10% фетальної сироватки теляти (Biowest, Франція). Усі клітинні лінії культивували у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 , за температури 37 °С. Клітини пересівали двічі на тиждень зі щільністю посіву $2\text{--}4 \times 10^4$ клітин на квадратний сантиметр поверхні.

Для оцінки показника виживаності клітин РПЗ та РМЗ людини після застосування різних режимів ФДТ використовували МТТ-тест. Клітини всіх досліджуваних ліній висаджували на лунки 96-лункових планшетів (SPL, Korea) в концентрації 110^4 клітин/лунку в поживному середовищі DMEM з 10% фетальної сироватки теляти та 40 мкг/мл гентаміцину, інкубували протягом 24 год (у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 за 37 °С), після чого проводили лазерне опромінення. Кількість живих клітин оцінювали за включенням МТТ (Sigma, США) (5 мг/мл фосфатно-сольового буферу). Для розчинення кристалів формазану у кожну лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (Serva, Німеччина). Величину оптичного поглинання розчину вимірювали за допомогою мультилункового спектрофотометра («STAT FAX 2100», США) за довжини хвилі 540 нм (ОП 540), визначали кількість живих клітин щодо контролю і проводили визначення життєздатності.

Під час проведення досліджень використовували випромінювання напівпровідникових лазерних приладів (Фотоніка Плюс, Україна) з довжинами хвиль 405, 445, 660, 635 та 810 нм. Потужність світлового випромінювання вимірювали за допомогою вимірювача оптичного випромінювання Ophir Optronics (США).

При лазерному опроміненні клітин РПЗ (DU-145, LNCaP) у якості ФС використовували 5-амінолевуленову кислоту (5-ALA) (1 мМоль), при опроміненні клітин РМЗ (MCF-7) — до клітин додавали доксорубіцин (DOX) в концентрації 1 мкг/мл.

Для перевірки ефективності та оптимізації схем опромінення клітинних ліній РПЗ (DU-145, LNCaP) використовували лазерне випромінювання з довжинами хвиль 405 та 635 нм; час опромінення — 3, 7, 10, 12 хв та, відповідно, дози опромінення — 3,6; 8,4; 12; 14,4 Дж/см², щільність потужності лазерного випромінювання становила 20 мВ/см².

Для клітин ліній РМЗ в поєднанні з DOX використовували лазерне випромінювання 445 та

660 нм; щільність потужності становила 2 мВт/см² та 10 мВт/см² з часом опромінення 5 хв і 10 хв відповідними дозами 0,6 і 1,2 Дж/см² та 3 і 6 Дж/см².

Для порівняння ефекту ФБМ клітини лінії MCF-7 були опромінені ІЧ лазером зі щільністю потужності 50 мВт/см²; довжина хвиль — 810 нм, час опромінення — 1, 5, 10 хв, дози опромінення — 3, 15, 30 Дж/см² відповідно.

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Усі дані отримані у трьох повторях і представляли як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD). Для оцінки значущості відмінностей між групами використовували тест Ст'юдента, критичний рівень статистичної значимості приймали рівним 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для клітинних ліній РПЗ людини (DU-145 та LNCaP) визначали цитотоксичний вплив лазерного випромінювання в поєднанні з 5-ALA. Відомо, що 5-ALA стимулює утворення в організмі протопорфірину, який є фототоксичним під впливом світла з подальшим утворенням синглетного кисню [12]. У цьому методі 5-ALA використовується в ролі ендogenous ФС для проведення ФДТ. До переваг ендogenous ФС можна віднести те, що вони не вводяться ззовні, а виробляються організмом за певних умов; мають низьку токсичність для здорових тканин та високу швидкість виведення з організму. Окрім того, передбачається, що проникнення молекул 5-ALA через мембрани клітин пухлини буде більшим, ніж для ФС з великими розмірами молекул. Нами було порівняно ефективність використання лазерів з довжинами хвиль, що співпадають з піками поглинання протопорфірину в короткохвильовій (405 нм) та довгохвильовій (635 нм) ділянках, з дозами опромінення 3,6; 8,4; 12; 14,4 Дж/см². Доза лазерного випромінювання коригувалася відповідно до різного часу опромінення (3, 7, 10, 12 хв) із однаковою щільністю потужності лазера 20 мВт/см² та з однаковою концентрацією 5-ALA (1 mM).

У дослідженнях з використанням клітинних культур DU-145 та LNCaP встановлено, що найбільша фотодинамічна активність для клітин обох ліній отримана за дози опромінення 10 Дж/см² із довжиною хвиль лазерного випромінювання 635 нм. За даних параметрів виживаність становила 65,0 та 73,0% для клітин DU-145 та LNCaP відповідно (рис. 1, 2).

Під час опромінювання клітин такою ж дозою, але з іншою довжиною хвилі — 405 нм, виживаність клітин для LNCaP та DU-145 становила 21,0 та 32,0% відповідно (рис. 3, 4). Вищий рівень виживаності DU-145 може бути пов'язаний з більшим ступенем злоякісності цих клітин [13, 14].

Дослідження ефективності ФДТ (у монорежимі або при поєднанні з DOX) щодо клітин РМЗ показало збільшення цитотоксичного впливу DOX на клітини лінії MCF-7 на 25,0% порівняно

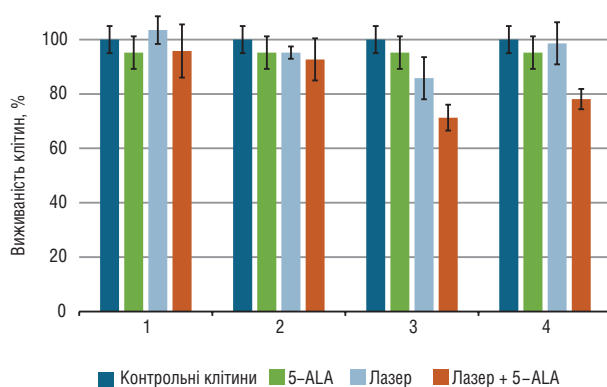


Рис. 1. Вживаність клітин DU-145 після застосування різних режимів опромінення в поєднанні з 5-ALA (довжина хвилі лазерного випромінювання 635 нм): 1—3 хв, 3,6 Дж/см²; 2—7 хв, 8,4 Дж/см²; 3—10 хв, 12 Дж/см²; 4—12 хв, 14,4 Дж/см²

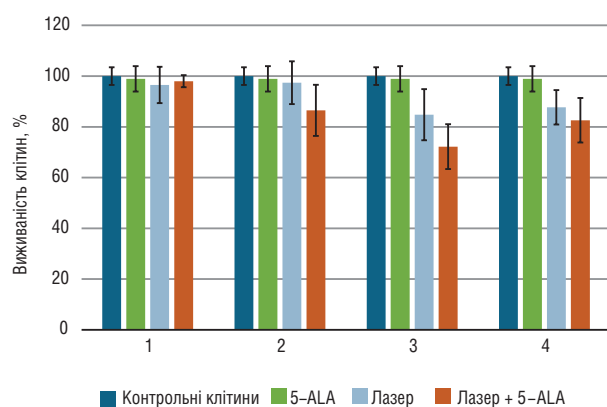


Рис. 2. Вживаність клітин LNCaP після застосування різних режимів опромінення в поєднанні з 5-ALA (довжина хвилі лазерного випромінювання 635 нм): 1—3 хв, 3,6 Дж/см²; 2—7 хв, 8,4 Дж/см²; 3—10 хв, 12 Дж/см²; 4—12 хв, 14,4 Дж/см²

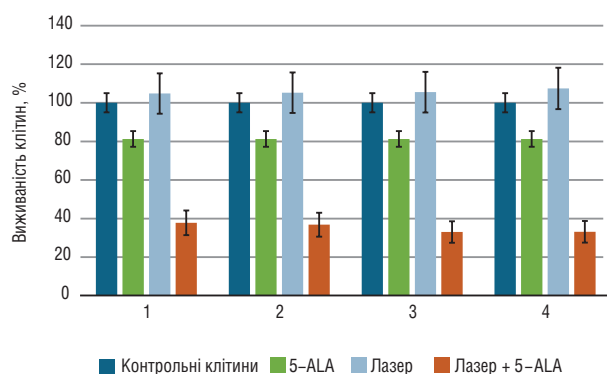


Рис. 3. Вживаність клітин DU-145 після застосування різних режимів опромінення в поєднанні з 5-ALA (довжина хвилі лазерного випромінювання 405 нм): 1—3 хв, 3,6 Дж/см²; 2—7 хв, 8,4; 3—10 хв, 12 Дж/см²; 4—12 хв, 14,4 Дж/см²

з контролем при використанні лазерного випромінювання з довжиною хвиль 445 нм (рис. 5), що співпадає з піком поглинання DOX (близько 450 нм). Однак найчастіше для збудження DOX використовується лазер з довжиною хвилі 660 нм, тому нами було порівняно ефективність застосування двох

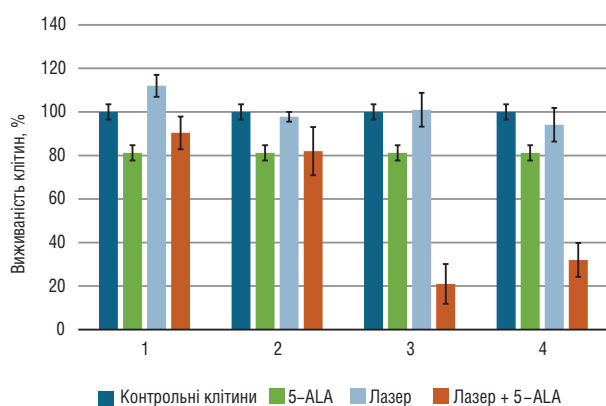


Рис. 4. Вживаність клітин LNCaP після застосування різних режимів опромінення в поєднанні з 5-ALA (довжина хвилі лазерного випромінювання 405 нм): 1—3 хв, 3,6 Дж/см²; 2—7хв, 8,4; 3—10 хв, 12 Дж/см²; 4—12 хв, 14,4 Дж/см²

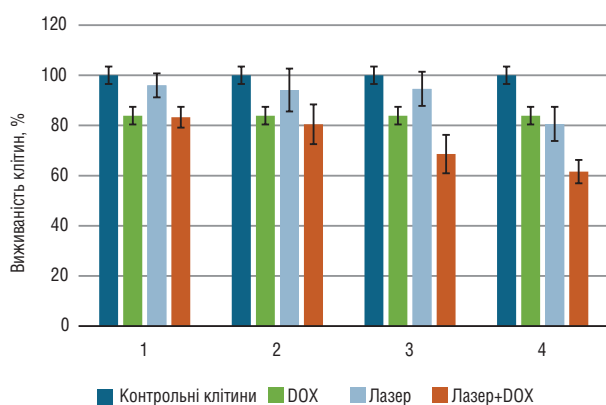


Рис. 5. Вживаність клітин MCF-7 після застосування різних режимів опромінення в поєднанні з DOX (довжина хвилі лазерного випромінювання 445 нм): 1—5 хв, 0,6 Дж/см²; 2—10хв, 1,2 Дж/см²; 3—5 хв, 3 Дж/см²; 4—10 хв, 6 Дж/см²

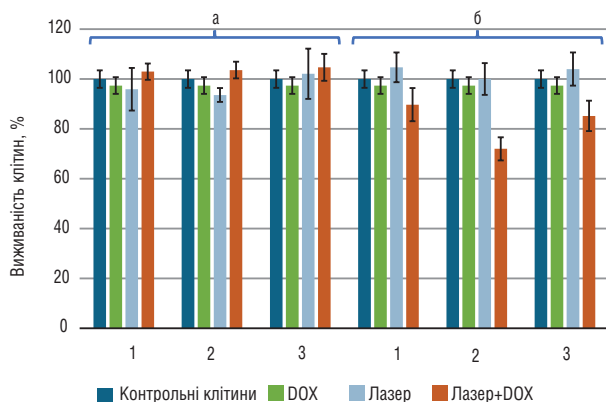


Рис. 6. Вживаність клітин MCF-7 після застосування різних режимів опромінення в поєднанні з DOX (довжина хвилі лазерного випромінювання 810 нм): 1—1 хв, 3 Дж/см²; 2—5 хв, 15 Дж/см²; 3—10 хв, 30 Дж/см². Опромінення проводили до (а) або після (б) додавання до клітин DOX

довжин хвиль для підбору оптимального опромінення DOX без додаткової токсичності для клітин. Виявлено, що виживаність клітин після опромінення лазером з довжиною хвилі 660 нм з DOX становила близько 80,0%, що підтверджує важли-

вість правильного підбору параметрів лазерного випромінювання залежно від використаної в якості ФС речовини.

Проведено дослідження з використанням лазерного випромінювання ІЧ спектру для збільшення токсичної дії DOX шляхом попередньої ФБМ клітин через підвищення накопичення хіміопрепарату в клітинах. У порівнянні з традиційним методом опромінення клітин лазером з довжиною хвиль 660 нм ІЧ випромінювання з довжиною хвиль 810 нм може проникати глибше та дозволить створити синергічний ефект низькоінтенсивного лазерного впливу (ФБМ) та токсичного впливу DOX.

Нами було проведено дослідження щодо вивчення виживаності клітин лінії MCF-7 за умови впливу DOX з попереднім опроміненням ІЧ лазером зі щільністю потужності 50 мВ/см² або після такого опромінення. Час опромінення клітин становив 1, 5, 10 хв з відповідною дозою опромінення — 3, 15, 30 Дж/см² (рис. 6).

Додаткове використання лазерного випромінювання з довжиною хвилі 810 нм в якості ФБМ дозволило підвищити загальний токсичний вплив DOX на клітини MCF-7. Експериментальні дані показали, що виживаність клітин після лазерного опромінення дозою 15 Дж/см² зменшилася на 31,0% порівняно з неопроміненими клітинами. Оскільки лазер 810 нм максимально рознесений з піком поглинання DOX, можна стверджувати про додаткове підвищення токсичності з використанням лазерного випромінювання шляхом ФБМ клітин без збудження хіміопрепарату.

ВИСНОВКИ

1. На культурах клітин РПЗ (DU-145, LNCaP) встановлено оптимальні параметри опромінення для отримання найвищої фотодинамічної активності ФС 5-ALA. Найбільш ефективним для вибраних клітинних ліній є лазерне випромінювання з довжиною хвиль 405 нм, щільністю потужності 20 мВ/см², час опромінення — 10 хв.

2. Використання лазерного випромінювання з довжиною хвилі, що точно співпадає з піком поглинання препаратів хіміотерапії, дозволяє збільшити їх токсичний вплив без підвищення дози та часу опромінення.

3. Додаткове використання лазерного опромінення для ФБМ поряд із введенням DOX дозволяє підвищити його загальний токсичний вплив на клітини MCF-7. Планується подальше дослідження використання ФБМ у поєднанні з ФДТ для покращення результатів лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncol* 2010; **6** (6): 929–40.
- Lanzafame RJ. Photobiomodulation: an enlightened path emerges. *Photomed Laser Surg* 2013; **31** (7): 299–300.

3. Hasan T, Ortel B, Solban N, Pogue B. Photodynamic therapy of cancer. *Cancer Med* 2003; **7**: 537–48.
4. Hamblin MR, Carroll JD, de Freitas LF, et al. Low-level light therapy: photobiomodulation. 2018
5. Wilson BC, Patterson MS, Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. *Lasers Med Sci* 1997; **12** (3): 182–99.
6. Chepurna O, Shton I, Kholin V, et al. Photodynamic therapy with laser scanning mode of tumor irradiation. B: 16th Conference on optical fibers and their applications. International society for optics and photonics; 2015: 98161F-98161F.
7. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one — photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2004; **1** (4): 279–93.
8. Marmur ES, Schmults CD, Goldberg DJ. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg* 2004; **30**: 264–71.
9. Mitra S, Foster TH. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenylchlorin vs photofrin. *Photochem Photobiol* 2005; **81** (4): 849–59.
10. Mitra S. Photodynamic therapy: biophysical mechanisms and molecular responses. PhD thesis. University of Rochester, Rochester, New York, 2004. 260 p.
11. de Faria CM, Costa CS, Bagnato VS. Photobiomodulation effects on photodynamic therapy in HNSCC cell lines. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2021; **217**: 112170. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112170.
12. Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncol Rep* 2021; **29** (3): 911–6.
13. Kutsevol N, Naumenko A, Harahuts Y, et al. New hybrid composites for photodynamic therapy: synthesis, characterization and biological study. *Appl Nanosci* 2019; **9**: 881–8.
14. Kutsevol N, Kuziv Y, Bezugla T, et al. Application of new multicomponent nanosystems for overcoming doxorubicin resistance in breast cancer therapy. *Appl Nanosci* 2021; 1–11.

DETERMINATION OF EFFECTS AND OPTIMIZATION OF PHOTOBIMODULATION AND PHOTODYNAMIC THERAPY PARAMETERS FOR PROSTATE AND BREAST CANCER CELL LINES OF DIFFERENT MALIGNANCY GRADE

O.O. Lykhova, S.V. Konovalenko, O.M. Chepurna
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to investigate the effects of laser radiation of different intensities on prostate cancer (PC)

and breast cancer (BC) cell lines; to evaluate the prospects of combining light stimulation (photobiomodulation) and chemotherapy for synergistic effects on tumor cells. **Object and methods:** PC cell lines of different malignancy grade (LNCaP and DU-145) and BC cell line (MCF-7) were used in the study. The radiation of the semiconductor laser device (Photonics Plus, Ukraine) with wavelengths of 405, 445, 660, 635 and 810 nm was used to irradiate cells. The power of light radiation was measured using an optical radiation meter Ophir Optonics (USA). As the photosensitizer (PHS), 5-aminolevulinic acid (5-ALA) (1 mmol) was applied to LNCaP and DU-145 cells; doxorubicin (DOX) at a concentration of 1 µg/ml was added to the MCF-7 cells. The statistical analysis of the results was performed with the software package Statistics 6.0. **Results:** It has been found out on PC cells lines (LNCaP and DU-145) that the most optimal parameters of laser radiation for obtaining the highest photodynamic activity of 5-ALA are as follows: wavelength 405 nm, irradiation time 10 min, power density 20 mW/cm². It has been shown that the cytotoxic effect of DOX towards BC cells (MCF-7) is enhanced by laser radiation with the wavelength of 445 nm, which is equal to the peak of DOX absorption. Additionally, used as photobiomodulation, laser radiation with a wavelength of 810 nm before the administration of chemotherapeutic drug can increase its overall toxic effect on MCF-7 cells. **Conclusions:** the use of laser radiation with the wavelength which is equivalent to the chemotherapeutic drug absorption peak can increase its toxic effects without increasing the dose and irradiation time. The additional application of laser radiation for photobiomodulation increases the overall toxic effect of a chemotherapeutic agent towards tumor cells.

Key words: prostate cancer, breast cancer, cell lines, laser irradiation, photodynamic therapy, photobiomodulation, doxorubicin.

Адреса для листування:

Чепурна О.М.
03022 Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: ok.chepurna@gmail.com

Одержано: 29.09.2021