

Ukr Neurosurg J. 2023;29(2):11-21
doi: 10.25305/unj.273699

Ефекти фотодинамічного впливу із застосуванням хлорину Е6 на клітини гліобластоми лінії U251 *in vitro*

В.Д. Розуменко¹, Л.Д. Любич², Л.П. Стайно², Д.М. Єгорова², В.В. Васлович³, А.В. Розуменко¹, О.С. Комарова^{4,5}, А.В. Дащаківський¹, В.М. Ключка¹, Т.А. Малишева⁶

¹ Відділ нейроонкології та нейрохірургії дитячого віку, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

² Лабораторія культивування тканин відділу нейропатоморфології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

³ Лабораторія електронної мікроскопії відділу нейропатоморфології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

⁴ ПП «Фотоніка Плюс», Черкаси, Україна

⁵ Кафедра виробництва приладів, Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського, Київ, Україна

⁶ Відділ нейропатоморфології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Надійшла до редакції 09.02.2023
Прийнята до публікації 03.05.2023

Адреса для листування:

Любич Лариса Дмитрівна,
Лабораторія культивування тканин,
Інститут нейрохірургії
ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН
України, вул. Платона Майбороди,
32, Київ, 04050, Україна, e-mail:
lyubichld@gmail.com

Мета: дослідити ефект фотодинамічного впливу із застосуванням хлорину Е6 у культурах клітин стандартизованої лінії U251 гліобластоми (ГБ) людини за різних режимів лазерного опромінення (ЛО) *in vitro*.

Матеріали і методи. Сформовано групи клітинних культур ГБ людини лінії U251 залежно від умов культивування та екзогенного впливу: 1) контрольні – культивовані у стандартному поживному середовищі (MEM з L-глутаміном, 1 ммоль пірувату натрію, 10% фетальної телячої сироватки) та дослідні: 2) культивовані з додаванням фотосенсибілізатора хлорину Е6 (1,0, 2,0 та 3,0 мкг/мл); 3) культивовані у поживному середовищі без додавання хлорину Е6 та піддані ЛО (діапазон інтенсивності – 0,4–0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим); 4) культивовані у поживному середовищі з додаванням хлорину Е6 та піддані ЛО у зазначених режимах. Проведено прижиттєве динамічне спостереження з фотореєстрацією (флуоресцентна і світлова мікроскопія, оглядові методики, прижиттєве забарвлення вітальним барвником (0,2% розчин трипанового синього), морфометричні дослідження (мітотичний індекс, щільність життєздатних клітин).

Результати. Культури клітин ГБ людини лінії U251 характеризуються формуванням своєрідних міжклітинних зв'язків (ретикулярної гістоархітекtonіки) пухлинних клітин з високим поліморфізмом і активністю проліферації. Хлорин Е6 інкорпорується в цитоплазму клітин лінії U251 зі збереженням інтенсивності флуоресценції впродовж 72 год (термін спостереження). Інтенсивність флуоресценції хлорину Е6, інкорпорованого пухлиннонетрансформованими клітинами фетального головного мозку щурів (E14-16), є набагато слабшою. За впливу хлорину Е6 (1,0, 2,0 та 3,0 мкг/мл) дозозалежно наростають цитодеструктивні процеси в культурі клітин U251 з прогресивною втратою життєздатності та зниженням величини мітотичного індексу. За впливу ЛО у досліджених режимах життєздатність клітин лінії U251 дозозалежно знижується вже через 1 год після опромінення із подальшим зниженням через 24 год (найбільш значуще (~30%) – за дози ЛО 75–90 Дж/см² в імпульсному режимі). За поєднаного впливу хлорину Е6 (2,0 мкг/мл) та ЛО життєздатність клітин лінії U251 дозозалежно знижується через 1 год після впливу в 4,5–10,0 разів, найбільш значуще (~80%) – за дози ЛО 75–90 Дж/см² в імпульсному режимі. Через 24 год спостереження за всіх режимів поєднаного впливу хлорину Е6 та ЛО життєздатних клітин у культурах клітин лінії U251 не виявлено.

Висновки. Установлено достатню ефективність цитодеструктивного впливу хлорину Е6 (2,0 мкг/мл, попередня інкубація протягом 6–24 год) та найменшої дослідженої дози ЛО (25 Дж/см²) в імпульсному режимі у культурі клітин ГБ людини лінії U251. Використання вітального барвника дає змогу виявити цитотоксичні ефекти у культурі пухлинних клітин лінії U251 на ранньому етапі (упродовж 1 год після впливу хлорину Е6 та ЛО).

Ключові слова: лазерне опромінення; хлорин Е6; культура клітин гліобластоми людини U251; цитодеструктивні ефекти; мітотичний індекс; життєздатність клітин

Гліобластома (ГБ) – найпоширеніше злоякісне новоутворення серед первинних пухлин головного мозку та інших пухлин центральної нервової системи (ЦНС) [1, 2], яке відповідно до затвердженої

WHO оновленої редакції класифікації пухлин ЦНС (2021) віднесено до IDH wildtype [3]. Застосування комбінованого лікування (хірургічне видалення, променева та хіміотерапія) – сучасного стандарту

Copyright © 2023 В.Д. Розуменко, Л.Д. Любич, Л.П. Стайно, Д.М. Єгорова, В.В. Васлович, А.В. Розуменко, О.С. Комарова, А.В. Дащаківський, В.М. Ключка, Т.А. Малишева



Робота опублікована під ліцензією Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

курації ГБ [4] суттєво збільшує загальну виживаність пацієнтів із первинними ГБ [5]. Однак ГБ залишається однією з найрезистентніших до лікування первинних злоякісних пухлин ЦНС, що мають прогресивний перебіг і прогресують. Більшість випадків продовженого росту/рецидивів виникають у крайовій (перифокальній) ділянці хірургічної порожнини через інвазивні властивості гліом та наявність резидуальних пухлинних клітин [6], оскільки характер поширення ГБ і ступінь хірургічної резекції складно остаточно оцінити при застосуванні класичних хірургічних підходів та методів інтраопераційної візуалізації. Для вирішення цієї проблеми запропоновано низку методів, зокрема фотодинамічні (фотодинамічна діагностика, видалення пухлини при флуоресцентному контролі (флуоресцентно-керована хірургія) і ад'ювантна фотодинамічна терапія (ФДТ)) [6, 7].

Фотодинамічна терапія – це метод, що дає змогу одночасно візуально ідентифікувати поширеність (межі) пухлинної тканини та селективно її руйнувати. Вона передбачає два етапи: введення фоточутливого агента (фотосенсибілізатора (ФС)) та його активацію світловими променями для спрямованого впливу на пухлинні клітини. Після введення (внутрішньовенного, внутрішньочеревинного, локального або перорального) ФС без перешкод долають гематоенцефалічний бар'єр і селективно накопичуються у пухлинній тканині порівняно з нормальними тканинами головного мозку (співвідношення становить 50:1 і 3:1 відповідно) [8].

Метод ФДТ ґрунтується на цитотоксичних ефектах, спричинених каскадом молекулярних подій. Активація ФС, селективно акумульованого в клітинах новоутворення, світловими променями відповідної довжини хвилі [9, 10] генерує синглетний молекулярний кисень і реактивні форми кисню, які запускають у пухлинних клітинах фотохімічні реакції з руйнуванням їхніх макромолекул, що призводить до загибелі клітин пухлин (через некроз, апоптоз, автофагію та інші варіанти програмованої клітинної смерті) і активує механізми як прямих цитодеструктивних, так і опосередкованих імунomodуювальних протипухлинних ефектів, із залученням ланок вродженого і набутого імунного захисту [10–13].

Розроблено ФС 1, 2 і 3-го покоління, останні ще не дозволені для клінічного застосування. В експериментальних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* підтверджена ефективність ФДТ пухлин головного мозку з використанням ФС 1-го і 2-го покоління, як окремо [14–16], так і у поєднанні з радіотерапією, хіміотерапією, сонодинамічною терапією або інгібіторами рецептора епідермального фактора росту (EGFR) [17–21]. Результати клінічних досліджень (більшість – неконтрольовані, фази I/II) із застосуванням ФС 1-го і 2-го покоління (HrD, талапорфін натрію, порфімер натрію, 5-ALA) [22–27], попри труднощі з аналізом та оцінкою ефективності лікування через істотні відмінності за схемами проведення, засвідчують, що ФДТ сприяє збільшенню зони деструкції пухлини під час операції та тривалості виживаності, підвищує якість життя пацієнтів із злоякісними гліомами, має низьку системну токсичність.

Ефективність фотодинамічного впливу на сенсibiliзовану клітину визначається внутрішньоклітинною концентрацією ФС, його локалізацією в клітинних компартментах, фотохімічною активністю, а також дозою лазерного опромінення (ЛО). Тому актуальною є розробка експериментальних моделей ФДТ для оптимізації доз і режимів ЛО. Раніше повідомляли про перспективність ФДТ із застосуванням хлорину Е6 на моделях гліоми щурів С6 і 101.8 *in vivo* [28]. Хлорин Е6 є ФС 2-го покоління (Рис. 1).

Аналіз наукових ресурсів для опрацювання адекватних методологічних підходів доводить актуальність і доцільність проведення доклінічних досліджень впливу ФДТ на моделі пухлинного росту *in vitro*.

Мета: дослідити ефект фотодинамічного впливу із застосуванням хлорину Е6 у культурах клітин стандартизованої лінії U251 гліобластоми людини за різних режимів лазерного опромінення *in vitro*.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на культурах клітин ГБ людини лінії U251. Кріоконсервовані зразки клітин (надані «Клітинним банком ліній тканин людини та тварин», Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є.Кавецького НАН України, Київ) розморожували на водяній бані впродовж 30 хв за температури 38 °С, суспендували в поживному середовищі (МЕМ з L-глутаміном («Biowest», Франція), 1 ммоль пірувату натрію, 10% фетальної телячої сироватки («Biowest», Франція)),

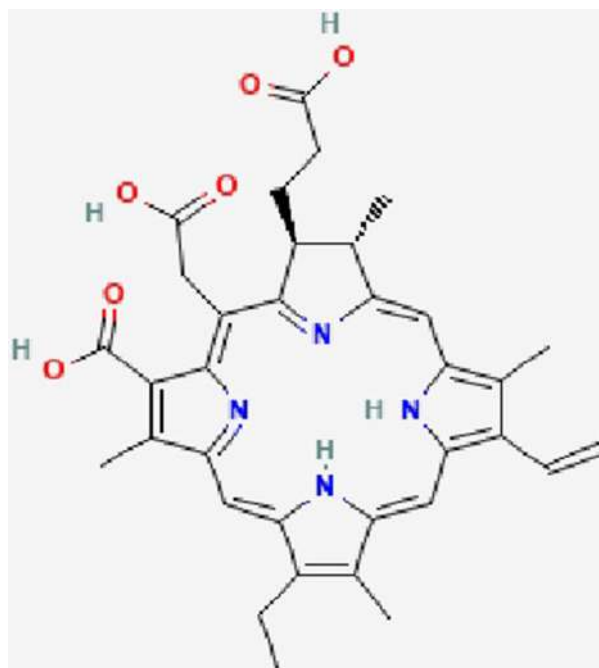


Рис. 1. Хімічна структура хлорину Е6 (молекулярна формула $C_{34}H_{36}N_4O_6$, інші відомі назви – photochlorine, Photolon, Phytochlorin, Phytochlorine) [29]

та поміщали у культуральні пластикові флакони (92 × 51 × 29 см, «TPP Techno Plastic Products AG», Швейцарія) у кількості $0,1 \cdot 10^6$ клітин/8 мл поживного середовища. Культури тримали в CO_2 -інкубаторі («Nuve», Туреччина) у стандартних умовах (95% вологості, 37 °C, 5% CO_2) упродовж 3 пасажів. Зміну поживного середовища здійснювали кожні три доби. Динамічне спостереження з поетапною мікрофотореєстрацією проводили за допомогою інвертованого мікроскопа «Nikon S-100» (Японія). Клітини з 4-го пасажу суспендували у поживному середовищі та в кількості $2 \cdot 10^6$ переносили в пластикові чашки Петрі (d – 35 мм, «SPL», Південна Корея) на покривні скельця, попередньо вкриті поліетиленіміном («Sigma-Aldrich, GmbH», Німеччина), додавали поживне середовище (2 мл) і культивували до досягнення моношару (75–80%).

Для дослідження безпосередніх ефектів хлорину Е6 у культури клітин лінії U251 зі сформованим моношаром додавали фотосенсибілізуювальний агент (у концентрації 1,0, 2,0 та 3,0 мкг/мл), потім культури тримали в CO_2 -інкубаторі («Nuve», Туреччина) та проводили динамічне спостереження з мікрофотореєстрацією за допомогою інвертованого мікроскопа «Nikon S-100» упродовж 48–72 год. Флуоресцентне дослідження здійснювали за допомогою мікроскопа AxioPhot («Opton», Німеччина) із застосуванням флуоресцентних фільтрів (λ – 500–680 нм). Для порівняння селективності інкорпорації ФС у клітини лінії U251 хлорин Е6 також додавали до культур нейрогенних клітин фетального головного мозку щура, отриманих за протоколом [30].

Для дослідження безпосередніх ефектів впливу ЛО культури клітин лінії U251 зі сформованим моношаром піддавали ЛО за допомогою устаткування «LIKA-surgeon» («Фотоніка-Плюс», Україна). Для цього чашки Петрі з культурами розміщували під вертикальним оптоволоконним лазерним виводом (h – 5 см) та піддавали опроміненню з рівномірним охопленням площі моношару світловими променями (λ – 660 нм) за різних режимів (діапазон інтенсивності – 0,4–0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим). Після цього культури тримали в CO_2 -інкубаторі («Nuve», Туреччина) і проводили динамічне спостереження з мікрофотореєстрацією за допомогою інвертованого мікроскопа «Nikon S-100» упродовж 24 год та флуоресцентне дослідження.

Для дослідження поєданого впливу хлорину Е6 і ЛО (ФДТ) у культури клітин лінії U251 зі сформованим моношаром додавали фотосенсибілізуювальний агент (у концентрації 1,0 та 2,0 мкг/мл) і тримали в CO_2 -інкубаторі («Nuve», Туреччина) упродовж 4 або 24 год. Після цього чашки з культурами розміщували під вертикальним оптоволоконним лазерним виводом (h – 5 см) та піддавали опроміненню світловими променями (λ – 660 нм) за різних режимів, як зазначено вище. Потім культури тримали в CO_2 -інкубаторі («Nuve», Туреччина) і проводили динамічне спостереження з мікрофотореєстрацією за допомогою інвертованого мікроскопа «Nikon S-100» упродовж 24 год та флуоресцентне дослідження.

Для прижиттєвого визначення цитотоксичного впливу хлорину Е6 та ЛО культури клітин лінії U251 зі сформованим моношаром піддавали впливу різних дослідних умов (описаних вище) з додаванням у культуральне середовище вітального барвника (0,2% розчин трипанового синього («Merck», Німеччина)) і

проводили прижиттєве спостереження життєздатності культур клітин лінії U251 за допомогою інвертованого мікроскопа «Nikon S-100».

Для подальшого аналізу сформовано групи клітинних культур лінії U251 залежно від умов культивування та екзогенного впливу: 1) контрольні – культивовані у стандартному поживному середовищі (MEM з L-глутаміном, 1 ммоль пірувату натрію, 10% фетальної телячої сироватки) та дослідні: 2) культивовані за умов додавання ФС хлорину Е6 (1,0, 2,0 та 3,0 мкг/мл); 3) культивовані у поживному середовищі без додавання ФС та піддані ЛО (діапазон інтенсивності – 0,4–0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим); 4) культивовані за умов додавання хлорину Е6 та піддані ЛО (діапазон інтенсивності – 0,4–0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим).

Контрольні та дослідні культури клітин фіксували в 10% нейтральному формаліні («Bio-Optica», Італія) і забарвлювали гематоксилином та еозином за Караччі. Мікроскопічне дослідження і фотореєстрацію препаратів культур здійснювали за допомогою світлооптичного фотомікроскопа «Nikon Eclipse E200» (Японія). У кожному препараті аналізували особливості будови дослідних культур порівняно з контрольними. Клітинний склад зони росту культур оцінювали за морфологічними характеристиками будови пухлинних клітин та їхньою здатністю формувати просторову гістоархітектуру моношару. Аналізували форму пухлинних клітин, наявність і розгалуженість відростків, структуру та форму ядер, характер розподілу хроматину, особливості міжклітинних взаємодій.

Кількісні дослідження контрольних та дослідних культур проводили в 10 репрезентативних полях зору зі стандартною вимірною шкалою (об'єкт-мікромір). Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою обробки цифрових зображень культур у 10 довільно обраних полях зору для кожного зразка за однакового збільшення ($\times 400$) за допомогою програмного забезпечення ImageView software (КНР, 2020), визначаючи на тестовій площі кількість життєздатних клітин, загальну кількість клітин, кількість клітин у стані мітотичного поділу. Мітотичний індекс (MI, %) розраховували як частку клітин з наявністю мітозів від загальної кількості клітин.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням пакета статистичних програм Statistica 8.0, програмне забезпечення StatSoft, Inc. (2007). Застосовували непараметричні методи варіаційної статистики (ранговий дискримінантний аналіз ANOVA Краскела-Уолліса для множинного порівняння декількох незалежних груп, U-критерій Манна-Уїтні для парного порівняння незалежних груп, тест Вілкоксона для парного порівняння залежних груп (у динаміці спостереження). Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Дані наведено як ($M \pm m$), де M – середнє арифметичне значення, m – стандартне відхилення від середнього арифметичного значення. Статистично значущими вважали відмінності за умови $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Культури клітин ГБ, яка належить до найзлякніших гліом головного мозку, характеризуються метаболічною та генетичною гетерогенністю, значним клітинним поліморфізмом

і високою мітотичною активністю, вияви яких в умовах *in vitro* корелюють зі ступенем анаплазії пухлинної тканини *in vivo*. В умовах культивування навіть найзляккісніші поліморфні форми ГБ виявляють здатність до диференціювання генетично запрограмованого астроцитарного фенотипу в частині пухлинних клітин. Проте значна гетерогенність клітинної популяції гліом зумовлює необхідність використання стандартизованих експериментальних умов моделей пухлинного росту. Нами як модель пухлинного росту використано культури клітин ГБ людини лінії U251 – клітинної лінії, отриманої зі зляккісної пухлини ГБ головного мозку людини методом експлантації, клітинний тип якої визначено як плеоморфний/астроцитоїдний [31].

Характеристика культур клітин ГБ людини лінії U251. Упродовж 24 год після пасажу клітин у культурах спостерігали утворення ланцюжків та щільних моношарових клітинних конгломератів, між якими розташовувалися пухлинні клітини без виразних ознак диференціації – з вузькою цитоплазмою та помірним поліморфізмом ядер, а також клітини зі сформованими відростками (Рис. 2, А). На 5-ту добу зафіксували посилення росту та розростання моношару пухлинних клітин. Клітини великі, з чіткими контурами, виразною цитоплазмою, великим ядром, уніполярної, трикутної, ромбоподібної, полігональної форми з видовженими відростками (Рис. 2, Б). У розрідженіших ділянках зони росту відзначали формування своєрідних міжклітинних зв'язків з формуванням ретикулярної гістоархітектоники. Таким чином, частина клітин ГБ лінії U251 виявляла ознаки диференціювання з формуванням характерних ретикулярних структур. Також у крайових ділянках зони росту культур спостерігали переважання клітин з широкою цитоплазмою, подібні до епітеліоїдного моношару. При досягненні конфлуентного етапу росту у культурах спостерігали характерні ретикулярні розрощення щільно укомплектованих пухлинних клітин з високим поліморфізмом і короткими дендритними відростками. На гістологічних препаратах в зоні росту культур у полі зору ($\times 400$) виявляли 2-3 пухлинні клітини в стані мітотичного поділу (МІ у середньому становив $(2,26 \pm 0,11)\%$ через 72 год культивування), що свідчить про високу активність проліферації (Рис. 2, В).

Ефекти хлорину Е6 у культурі клітин ГБ людини лінії U251. За даними флуоресцентного дослідження, в дослідних культурах клітин лінії U251 ФС хлорин Е6 накопичувався переважно в цитоплазмі пухлинних клітин. Інтенсивність флуоресценції інкорпорованого ФС зберігалася впродовж терміну спостереження (72 год, Рис. 3, А).

На відміну від клітин лінії U251 інтенсивність флуоресценції ФС, інкорпорованого пухлинноне-трансформованими клітинами фетального головного мозку щурів (Е14, використані як контроль внутрішньоклітинної інкорпорації ФС), була набагато слабшою (Рис. 3, В), що узгоджується з даними щодо більшої інтенсивності селективного накопичення ФС пухлинною тканиною [8].

Застосування різних концентрацій ФС (1,0, 2,0 та 3,0 мкг/мл) показало, що за впливу хлорину Е6 упродовж 24–48 год дозозалежно наростають цитодеструктивні процеси в культурі клітин ГБ людини лінії U251 (Рис. 3, Б).

За впливу хлорину Е6 у концентрації 1,0 мкг/мл через 48 год у культурах клітин лінії U251 спостерігали розрідження зони росту з появою великих лакун у клітинному моношарі. На тлі неушкоджених клітин виявляли дифузно розташовані дистрофовані або некробіотично змінені пухлинні клітини з редукцією відростків із закругленою цитоплазмою з ознаками прогресування ліпідної та гідропічної дистрофії цитоплазми і гіперхромними ядрами (Рис. 4, А). Деякі пухлинні клітини перетворилися на клітиниті та «голі» ядра. Кількість мітозів знижувалася до 1-2 у полі зору (МІ – $(1,14 \pm 0,09)\%$). Відзначено наявність патологічних форм мітозів [32] серед фігур мітотичного поділу пухлинних клітин (Рис. 4, Б).

За впливу хлорину Е6 у концентрації 2,0 мкг/мл у культурах клітин лінії U251 через 6 год спостерігали розрідження щільності клітинного моношару за рахунок ретракції і редукції відростків пошкоджених клітин у зоні росту. У збережених окремих ділянках ретикулярних структур виявлено клітини з ознаками дистрофії різного ступеня виразності. Ці зміни наростали впродовж наступних 24–48 год: збільшувався вміст пухлинних клітин з цитологічними ознаками дистрофії та некробіозу (пікнотичними ядрами і вакуолізованою цитоплазмою, Рис. 4, В), спостерігали до 1 мітозу на декілька полів зору (МІ – $(0,26 \pm 0,08)\%$), Рис. 4, Г).

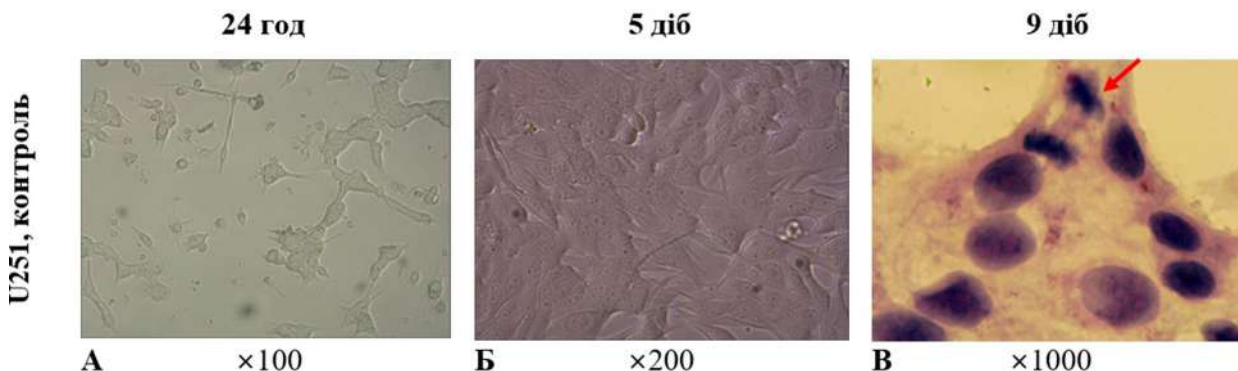


Рис. 2. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251, культивованих у стандартному поживному середовищі (контроль). Світлова мікроскопія, незабарвлена культура (А, Б); забарвлення гематоксиліном та еозином (В). Стрілкою позначено клітину в стадії мітозу (анафаза)

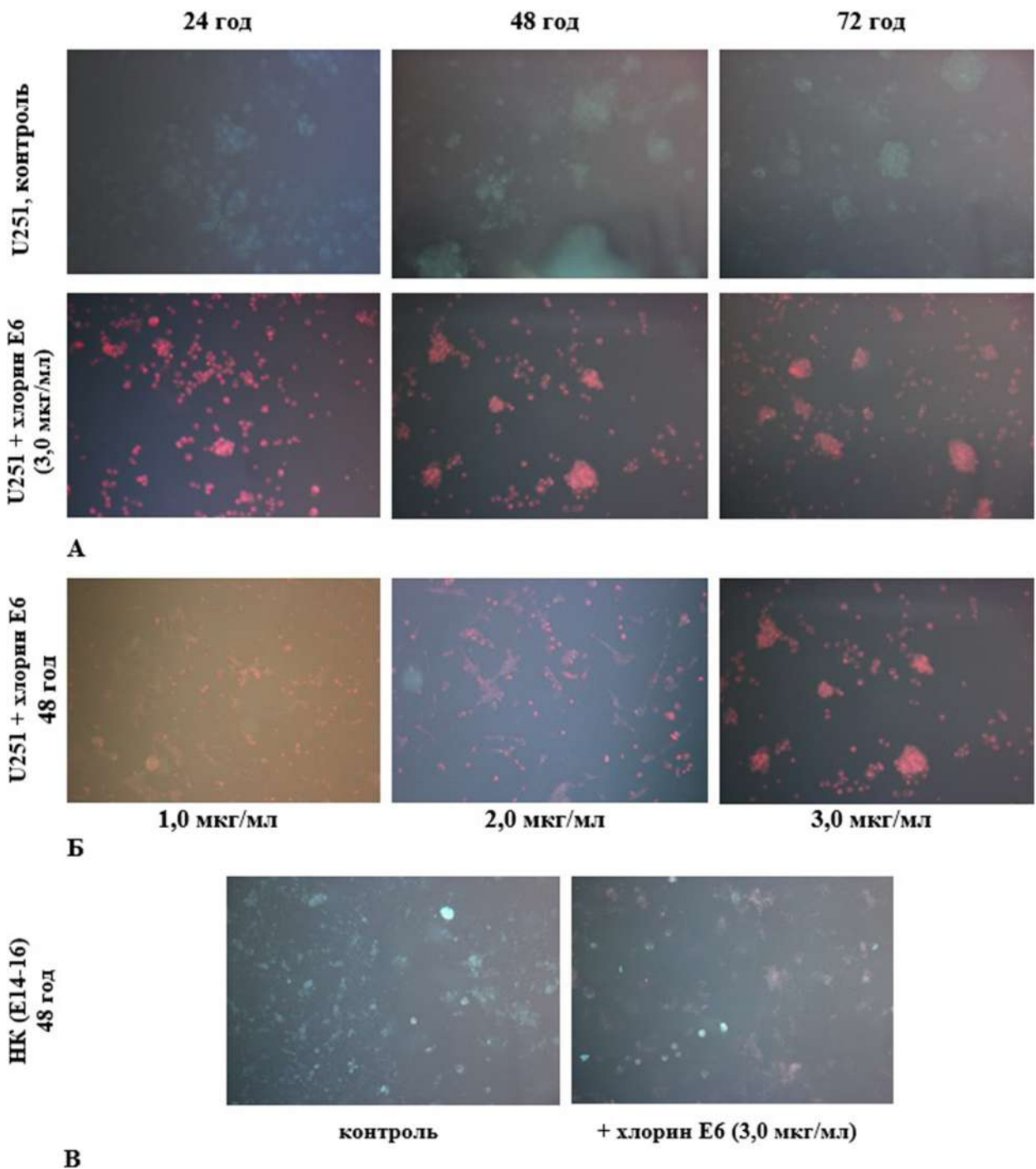


Рис. 3. Мікрофото культур, культивованих у стандартному поживному середовищі та після додавання хлорину Е6: А, Б – клітини гліобластоми людини лінії U251 за різних термінів інкубації (А) та різних концентрацій хлорину Е6 (Б); В – нейрогенні клітини (НК) тканини фетального головного мозку щурів (E14), контроль інкорпорації хлорину Е6. Флуоресцентна мікроскопія. $\times 200$

Збільшення тривалості інкубації клітин лінії U251 з хлорином Е6 з 6 до 48 год призводило до прогресивної втрати життєздатності пухлинних клітин у середньому на 20% ($p=9 \cdot 10^{-4}$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; $p=0,04$ порівняно з попереднім терміном інкубації, тест Вілкоксона; **Рис. 5, А**).

Через 72 год культивування в культурах клітин лінії U251 з додаванням ФС у концентрації 2,0 мкг/мл спостерігали стоншення зони росту, появу дегенерованих та некробіотично змінених пухлинних клітин зі зменшенням відростків, утворення клітин-

тіней. Величина МІ зменшилася з $(2,26 \pm 0,11)\%$ (контроль) до $(0,15 \pm 0,06)\%$ ($p=3,3 \cdot 10^{-5}$, U-тест Манна-Уїтні).

Отже, результати оцінки впливу хлорину Е6 засвідчують дозозалежний цитотоксичний ефект на пухлинні клітини ГБ людини лінії U251, який посилюється при збільшенні терміну інкубації культур із цим препаратом.

Ефекти ЛО за різних режимів у культурі клітин ГБ людини лінії U251. За впливу ЛО (інтенсивність – 0,4 Вт, доза – 50 Дж/см², безперервний режим) на

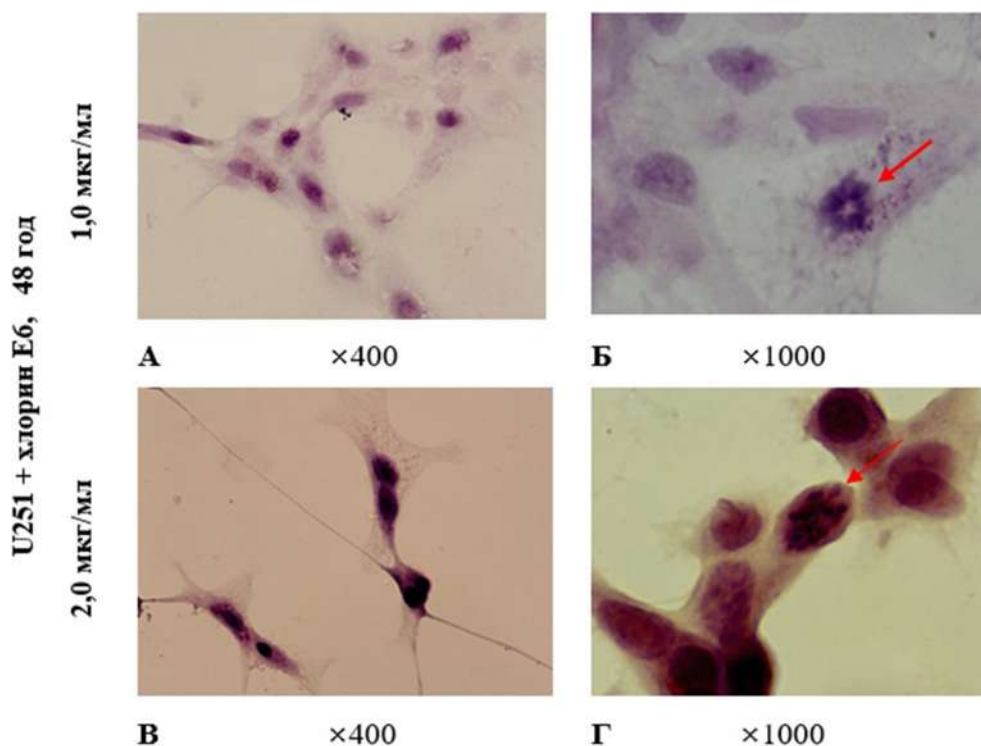


Рис. 4. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251, культивованих у стандартному поживному середовищі та після додавання хлорину E6 у різних концентраціях. Світлова мікроскопія. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Стрілками позначено патологічні форми мітозів (порожниста метафаза (Б), пульверизація хромосом (Г))

окремих ділянках зони росту культур ГБ лінії U251 виявляли розрідження клітинного моношару за рахунок десквамації дегенерованих клітин і клітини з чіткими ознаками дистрофії та некробіозу (редуковані відростки, закруглена цитоплазма, гіперхромні ядра). У зоні росту в клітинах зареєстрували вакуолізацію цитоплазми, появу значної кількості апоптичних тілець, що свідчить про апоптичний тип загибелі пухлинних клітин, ознаки ядерного поліморфізму. Деякі пухлинні клітини перетворилися на клітиніні, «голі» ядра, але в окремих ділянках зони росту культур мітотична активність клітин зберігалася. Подібна картина характерна для впливу ЛО з інтенсивністю 0,6 Вт, дозою 25 Дж/см², безперервний режим (**Рис. 6**). За тих самих умов (0,6 Вт, 25 Дж/см²), але в імпульсному режимі, ЛО спричиняло спонтанну загибель частини клітин лінії U251.

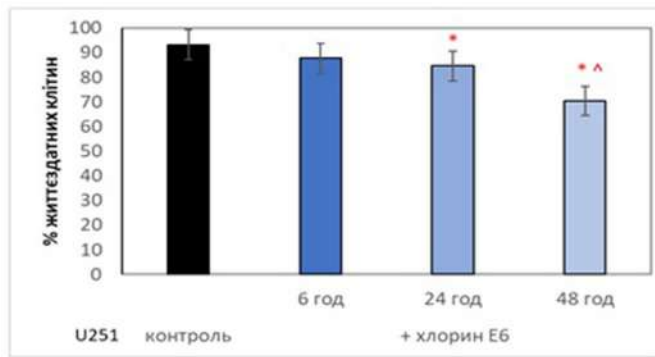
Збільшення дози ЛО до 50 Дж/см² у безперервному режимі з потужністю 0,6 Вт призвело до збільшення дистрофічних та некробіотичних змін у клітинах лінії U251, появи значної кількості апоптичних тілець. За тих самих умов (0,6 Вт, 50 Дж/см²), але в імпульсному режимі, ЛО спричиняло посилення руйнівних процесів у зоні росту клітин лінії U251 (**Рис. 6**), некробіотичні процеси спонтанної загибелі були характерні для більшості клітин зони росту.

Після впливу ЛО потужністю 0,6 Вт, дозами 75 та 90 Дж/см², як у безперервному, так і в імпульсному режимі, виявлено посилення руйнації зони росту і посилення дистрофічних та некробіотичних змін у клітинах (**див. Рис. 6**). У деяких клітинах спостерігали коагуляцію хроматину з перетворенням

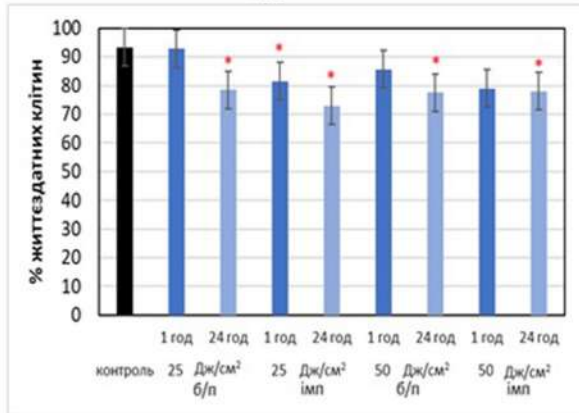
на різко базофільну гомогенну масу (пікноз), що свідчить про порушення цілісності ядерної мембрани. На цитологічних препаратах у збережених ділянках зони росту зареєстровано збільшення кількості дистрофічно змінених клітин з появою великої кількості клітин-тіней та «голих ядер».

Збільшення потужності ЛО до 1 Вт призводило до різкого спустошення зони росту з майже субтотальним руйнуванням пухлинних клітин. Після ЛО у безперервному режимі з потужністю 1 Вт, дозою 50 Дж/см² у зоні росту спостерігали дифузно розташовані окремі пухлинні клітини з відростками або невеликі скупчення таких клітин. На цитологічних препаратах виявлено збільшення вмісту патологічно змінених клітин з ознаками дегенерації.

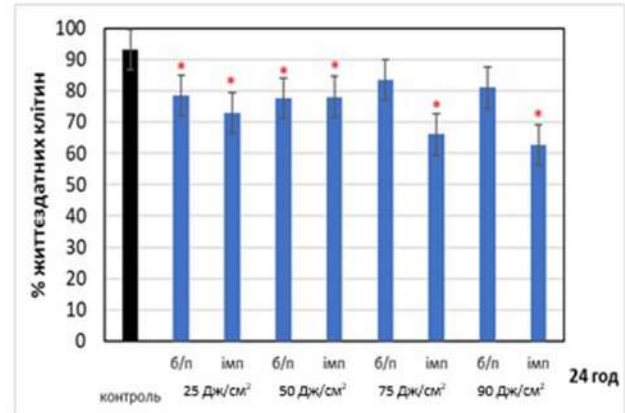
Отже, результати дослідження з морфометричною оцінкою особливостей різних режимів впливу ЛО на культури клітин ГБ лінії U251 свідчать про додозалежний цитотоксичний ефект його дії. Збільшення потужності від 0,4 до 1,0 Вт і дози від 25 до 90 Дж/см² у безперервному режимі призводить до руйнівних змін у гістоархітектоніці зони росту (від ретракції зони росту з утворенням лакун різного розміру за найнижчих показників ЛО до грубої руйнації архітектоніки моношару і значних масивів клітинного спустошення за найвищих показників ЛО). Також відзначено зниження мітотичної активності пухлинних клітин та наростання дистрофічно-дегенеративних незворотних змін аж до некробіозу і некрозу з подальшою десквамацією загиблих клітин з адгезивної поверхні. Такий ефект посилюється за тих самих характеристик ЛО в імпульсному режимі.



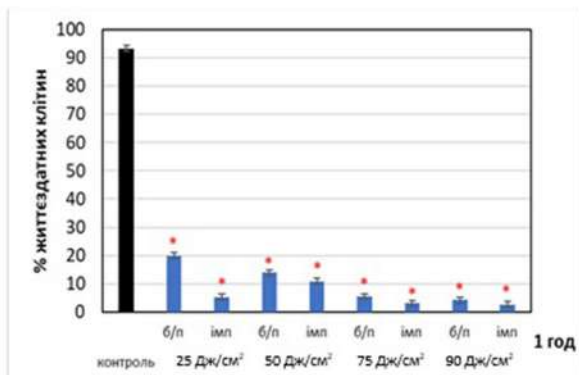
А



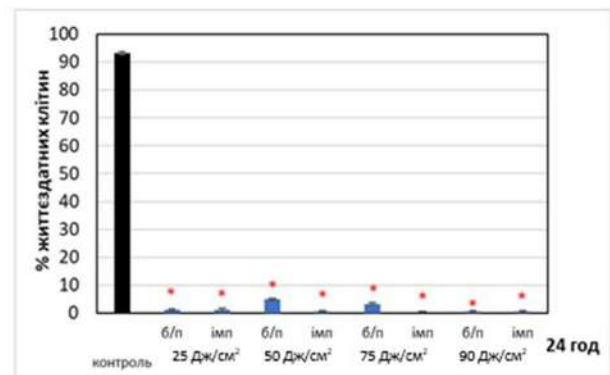
Б



В



Г



Д

Рис. 5. Відносна кількість життєздатних пухлинних клітин у культурі клітин гліобластоми людини лінії U251: А – залежно від терміну інкубації з хлорином Е6 (2,0 мкг/мл); Б, В – за впливу різних режимів лазерного опромінення (0,6 Вт); Г, Д – за поєднаного впливу хлорину Е6 (2,0 мкг/мл, попередня інкубація протягом 6 год) та різних режимів лазерного опромінення (0,6 Вт). * – $p < 0,05$ порівняно з контролем (U-тест Манна-Уїтні); ^ – $p = 0,04$ порівняно з попереднім терміном інкубації (тест Вілкоксона). Б/п – безперервний режим; імп – імпульсний режим

Дослідження впливу ЛО (λ – 660 нм, інтенсивність – 0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) за допомогою прижиттєвого забарвлення вітальним барвником трипановим синім (0,2%) показало, що життєздатність пухлинних клітин у культурі клітин лінії U251 залежно від застосованої дози починає знижуватися вже через 1 год після впливу. Зниження триває через 24 год спостереження ($p \leq 0,03$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; **див. Рис. 5, Б**). Виявлено певну залежність втрати життєздатності пухлинними клітинами від дози

опромінення та його режиму. Найбільш значуще зниження життєздатності (~30%) зафіксовано при дозі ЛО 75–90 Дж/см² в імпульсному режимі ($p \leq 0,003$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; **див. Рис. 5, В**).

Ефекти поєднаного впливу хлорину Е6 та ЛО за різних режимів у культурі клітин ГБ людини лінії U251. У культурах клітин лінії U251 після 24 год інкубації з хлорином Е6 (1,0 мкг/мл) та наступним ЛО (0,6 Вт, 75 Дж/см², безперервний та імпульсний режим) значно зменшувалася щільність клітинної популяції,

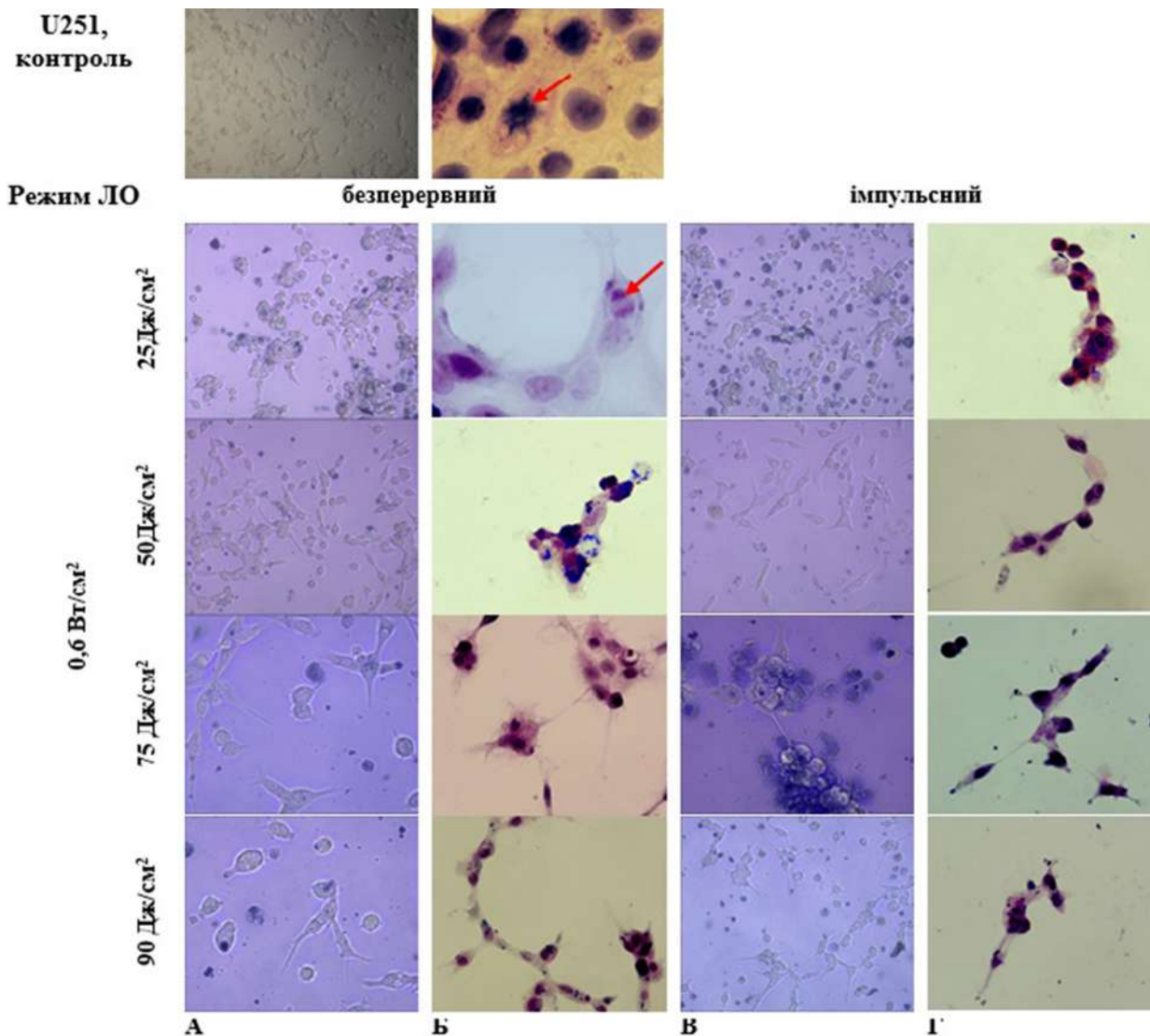


Рис. 6. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251 за впливу лазерного опромінення у різних режимах. Світлова мікроскопія. Забарвлення 0,2% трипановим синім (А, В) і гематоксиліном та еозином (Б, Г). Стрілками позначено клітини у стані мітозу

були наявні ознаки субтотальної атиповості (двоядерні клітини та клітини з мікроядрами), а також клітини на різних стадіях апоптозу (за опосередкованими структурними ознаками). У клітинах спостерігали вакуолізовану цитоплазму та ядерні аномалії (атипова форма ядер, каріорексис), а також ядра на різних стадіях загибелі клітин (від вакуолізації центральної частини ядра до каріопікнозу). Мітотичної активності не зафіксовано.

Збільшення концентрації хлорину Е6 до 2,0 мкг/мл з наступним ЛО з поступовим нарощуванням потужності та дози призводило до ще більших деструктивних змін клітинного моношару (**Рис. 7**).

Дослідження поєднаного впливу хлорину Е6 (2,0 мкг/мл, попередня інкубація протягом 6–24 год та ЛО у різних режимах (λ – 660 нм, інтенсивність – 0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) показало, що відносна кількість життєздатних пухлинних клітин у культурах клітин лінії U251 залежно від застосованої дози та режиму знижується вже через 1 год після впливу у 4,5–10,0 разів

(див. **Рис. 5, Г**). Найбільше зниження життєздатності (~80%) зафіксовано за дози ЛО 75–90 Дж/см² в імпульсному режимі ($p \leq 0,003$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; див. **Рис. 5, Г**). Через 24 год спостереження за всіх режимів опромінення життєздатних клітин у культурах клітин лінії U251 не виявляли ($p < 0,001$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; див. **Рис. 5, Д**), що дає підставу для висновку про достатню ефективність застосування найменшої дослідженої дози опромінення (25 Дж/см²) в імпульсному режимі за попередньої інкубації культури клітин з хлорином Е6 упродовж 6 год.

Таким чином, у результаті проведеного морфологічного та морфометричного дослідження цитотоксичного впливу фотосенсибілізуючого агента (хлорин Е6), впливу ЛО (λ – 660 нм, інтенсивність – 0,4–0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) та поєднаного впливу хлорину Е6 і ЛО у зазначених режимах встановлено, що за впливу хлорину Е6 упродовж 24–48 год дозозалежно наростають цитодеструктивні

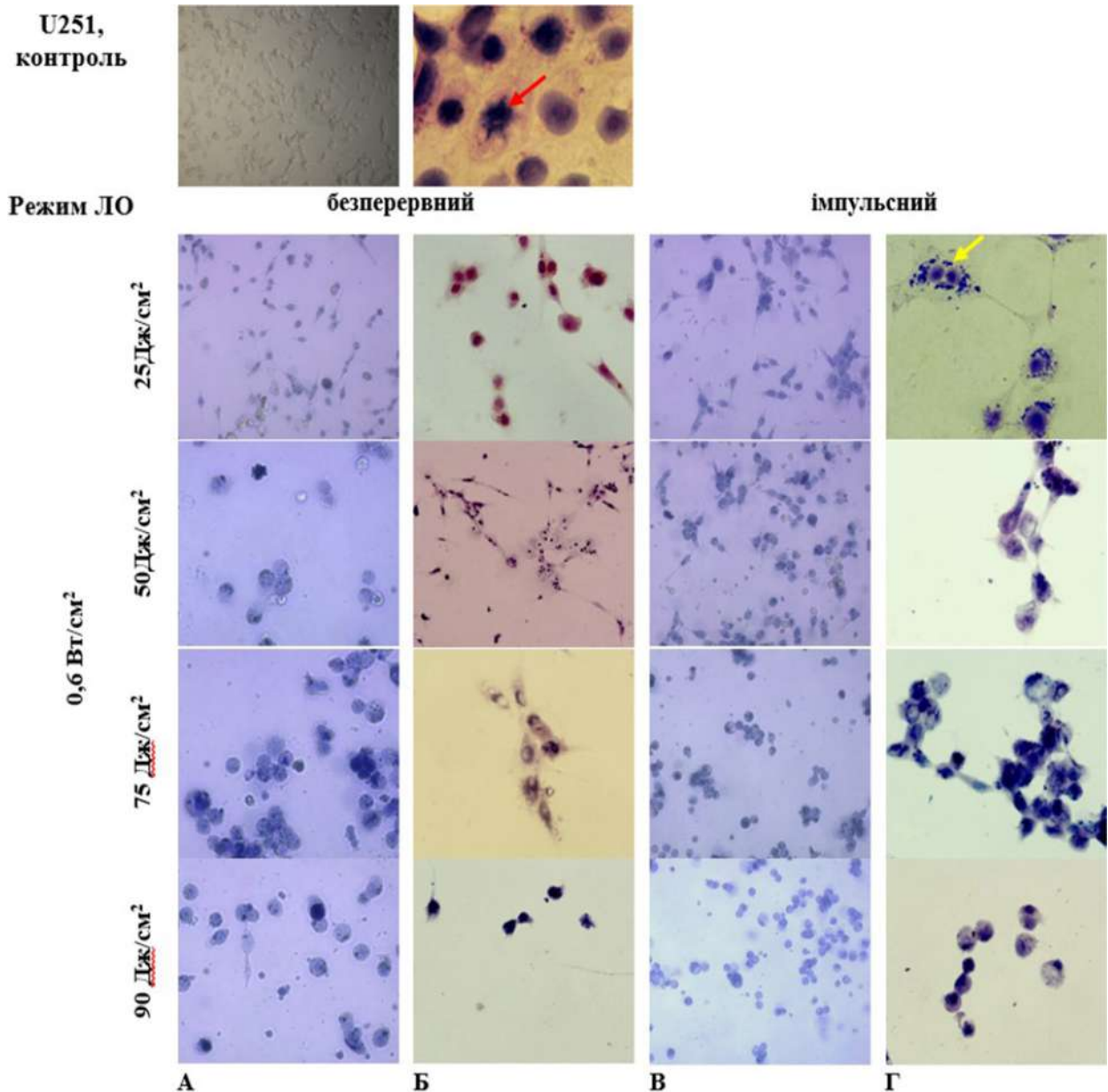


Рис. 7. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251 за поєднаного впливу хлорину Е6 (2,0 мкг/мл) та лазерного опромінення у різних режимах. Світлова мікроскопія. Забарвлення 0,2% трипановим синім (А, В) і гематоксиліном та еозином (Б, Г). Стрілками позначено клітину в стані мітозу (червона стрілка) та двоядерну клітину (жовта стрілка)

(дистрофічно-дегенеративні) процеси в культурі клітин ГБ людини лінії U251, поєднання впливу хлорину Е6 та ЛО зі збільшенням дози призводить до майже тотальної деструкції пухлинних клітин у культурі. Застосування вітального барвника (0,2% розчин трипанового синього) дає змогу зафіксувати цитотоксичні ефекти на ранньому етапі (упродовж першої години після поєднаного впливу хлорину Е6 та ЛО).

Спосіб прижиттєвого забарвлення культури пухлинних клітин вітальним барвником дає змогу оцінити потенційні цитотоксичні ефекти в культурі пухлинних клітин за впливу досліджених експериментальних умов, а також інших фізичних та хімічних агентів, що може стати основою для теоретичного обґрунтування розробки дієвих

способів швидкої оцінки чутливості пухлинних клітин у конкретному клінічному випадку (індивідуальна чутливість) до потенційних селективних антибластичних чинників у лікуванні нейроонкологічних захворювань.

Висновки

У результаті проведеного морфологічного та морфометричного дослідження у культурі клітин ГБ людини лінії U251 доведено цитодеструктивний вплив поєднаного застосування хлорину Е6 та ЛО і встановлено їх ефективні дози та режими.

1. Хлорин Е6 інкорпорується в цитоплазму клітин ГБ лінії U251 та зберігає інтенсивність флуоресценції впродовж терміну спостереження (72 год).

2. За впливу хлорину Е6 (1,0, 2,0 та 3,0 мкг/мл) дозозалежно наростають цитодеструктивні зміни в культурі клітин ГБ людини лінії U251 з прогресивною втратою життєздатності пухлинних клітин та зменшенням величини МІ.

3. За впливу ЛО (λ – 660 нм, інтенсивність – 0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) дозозалежно знижується життєздатність пухлинних клітин у культурі клітин ГБ людини лінії U251 вже через 1 год після впливу із подальшим зниженням через 24 год спостереження. Найбільш значуще зниження життєздатності (~30%) зафіксовано за дози ЛО 75–90 Дж/см² в імпульсному режимі.

4. За умов поєданого впливу хлорину Е6 (2,0 мкг/мл, попередня інкубація протягом 6–24 год) та ЛО у різних режимах (λ – 660 нм, інтенсивність – 0,6 Вт, доза – 25–90 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) дозозалежно знижується життєздатність пухлинних клітин у культурі клітин ГБ людини лінії U251 вже через 1 год після впливу, найбільш значуще (~80%) – за дози ЛО 75–90 Дж/см² в імпульсному режимі. Через 24 год спостереження за всіх режимів опромінення життєздатних клітин у культурах клітин лінії U251 не виявлено, що свідчить про достатню ефективність найменшої дослідженої дози опромінення (25 Дж/см²) в імпульсному режимі за попередньої інкубації культури клітин з хлорином Е6 упродовж 6 год.

5. Використання вітального барвника (0,2% розчин трипанового синього) дає змогу зареєструвати цитотоксичні ефекти на ранньому етапі (упродовж першої години після поєданого впливу хлорину Е6 та ЛО).

Подяка

Автори висловлюють щирю подяку старш. наук. співроб. відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України к-ту біол. наук Олександрі Лиховій за люб'язно надані зразки клітинної лінії U251 для культивування і дослідження.

Розкриття інформації

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування

Дослідження не мало спонсорської підтримки.

Дослідження є частиною науково-дослідної роботи (№ держреєстрації 0122U000331).

Список літератури

- Low JT, Ostrom QT, Cioffi G, Neff C, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBTRUS statistical report for clinicians. *Neurooncol Pract.* 2022 Feb 22;9(3):165-182. doi: 10.1093/nop/npac015
- Fedorenko Z, Michailovich Yu, Goulak L, Gorokh Ye, Ryzhov A, Soumkina O, Koutsenko L. CANCER IN UKRAINE, 2020 - 2021: Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine.* 2022;23.
- Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol.* 2021 Oct 5;23(12 Suppl 2):iii1-iii105. doi: 10.1093/neuonc/noab200
- Dupont C, Vermandel M, Leroy HA, Quidet M, Lecomte F, Delhem N, Mordon S, Reyns N. Intraoperative photoDynamic Therapy for Glioblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial. *Neurosurgery.* 2019 Jun 1;84(6):E414-E419. doi: 10.1093/neuros/nyy324
- Rozumenko AV, Kliuchka VM, Rozumenko VD, Fedorenko ZP. Survival rates in patients with the newly diagnosed glioblastoma: Data from the National Cancer Registry of Ukraine, 2008-2016. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 2018;(2):33-9. doi: 10.25305/unj.124878
- van Solinge TS, Nieland L, Chiocca EA, Broekman MLD. Advances in local therapy for glioblastoma - taking the fight to the tumour. *Nat Rev Neurol.* 2022 Apr;18(4):221-236. doi: 10.1038/s41582-022-00621-0
- Mahmoudi K, Garvey KL, Bouras A, Cramer G, Stepp H, Jesu Raj JG, Bozec D, Busch TM, Hadjipanayis CG. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 2019 Feb;141(3):595-607. doi: 10.1007/s11060-019-03103-4
- Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):384-9. doi: 10.1002/lsm.20338
- Dubey SK, Pradyuth SK, Saha RN, Singhvi G, Alexander A, Agrawal M, Shapiro BA, Puri A. Application of photodynamic therapy drugs for management of glioma. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines.* 2019 Dec;23(11n12):1216-28. doi: 10.1142/S1088424619300192
- Cramer SW, Chen CC. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. *Front Surg.* 2020 Jan 21;6:81. doi: 10.3389/fsurg.2019.00081
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005 Mar;2(1):1-23. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00030-X
- Kaneko S, Fujimoto S, Yamaguchi H, Yamauchi T, Yoshimoto T, Tokuda K. Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;32:1-13. doi: 10.1159/000469675
- Li F, Cheng Y, Lu J, Hu R, Wan Q, Feng H. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. *J Cell Biochem.* 2011 Oct;112(10):3035-43. doi: 10.1002/jcb.23228
- Velazquez FN, Miretti M, Baumgartner MT, Caputto BL, Tempesti TC, Prucca CG. Effectiveness of ZnPc and of an amine derivative to inactivate Glioblastoma cells by Photodynamic Therapy: an in vitro comparative study. *Sci Rep.* 2019 Feb 28;9(1):3010. doi: 10.1038/s41598-019-39390-0
- Розуменко В.Д., Семенова В.М., Стайно Л.П. Исследование эффекта фотодинамической терапии в культурах глиом головного мозга экспериментальных животных и человека. *Аспекты применения метода культивирования тканей в нейробиологии и нейроонкологии.* Киев: Интерсервис; 2018.
- Fontana LC, Pinto JG, Pereira AHC, Soares CP, Raniero LJ, Ferreira-Strixino J. Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line. *Lasers Med Sci.* 2017 Aug;32(6):1245-1252. doi: 10.1007/s10103-017-2227-5
- Skandalakis GS, Bouras A, Rivera D, Rizea C, Raj JG, Bozec D, Hadjipanayis CG. Photodynamic Therapy of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma in Combination with Radiation. *Neurosurgery.* 2020 Dec;67(Supplement_1):nyaa447_873. doi: 10.1093/neuros/nyaa447_873
- An YW, Liu HQ, Zhou ZQ, Wang JC, Jiang GY, Li ZW, Wang F, Jin HT. Sinoporphyrin sodium is a promising sensitizer for photodynamic and sonodynamic therapy in glioma. *Oncol Rep.* 2020 Oct;44(4):1596-1604. doi: 10.3892/or.2020.7695
- Zhang X, Guo M, Shen L, Hu S. Combination of photodynamic therapy and temozolomide on glioma in a rat C6 glioma model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Dec;11(4):603-12. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.10.007
- Sun W, Kajimoto Y, Inoue H, Miyatake S, Ishikawa T, Kuroiwa T. Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells.

- Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013 Feb;10(1):42-50. doi: 10.1016/j.pdpdt.2012.06.003
21. Fisher C, Obaid G, Niu C, Foltz W, Goldstein A, Hasan T, Lilje L. Liposomal Lapatinib in Combination with Low-Dose Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioma. *J Clin Med*. 2019 Dec 14;8(12):2214. doi: 10.3390/jcm8122214
 22. Chernov MF, Muragaki Y, Kesari S, McCutcheon IE (eds): Intracranial Gliomas. Part III - Innovative Treatment Modalities. *Prog Neurol Surg*. Basel, Karger. 2018; 32:1-13. doi: 10.1159/000469675
 23. Schipmann S, Mütter M, Stögbauer L, Zimmer S, Brokinkel B, Holling M, Grauer O, Suero Molina E, Warneke N, Stummer W. Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control. *J Neurosurg*. 2020 Jan 24:1-11. doi: 10.3171/2019.11.JNS192443
 24. Vermandel M, Dupont C, Lecomte F, Leroy HA, Tuleasca C, Mordon S, Hadjipanayis CG, Reyns N. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J Neurooncol*. 2021 May;152(3):501-514. doi: 10.1007/s11060-021-03718-6
 25. Lietke S, Schmutzer M, Schwartz C, Weller J, Siller S, Aumiller M, Heckl C, Forbrig R, Niyazi M, Egensperger R, Stepp H, Sroka R, Tonn JC, Rühm A, Thon N. Interstitial Photodynamic Therapy Using 5-ALA for Malignant Glioma Recurrences. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 7;13(8):1767. doi: 10.3390/cancers13081767
 26. Kobayashi T, Nitta M, Shimizu K, Saito T, Tsuzuki S, Fukui A, Koriyama S, Kuwano A, Komori T, Masui K, Maehara T, Kawamata T, Muragaki Y. Therapeutic Options for Recurrent Glioblastoma-Efficacy of Talaporfin Sodium Mediated Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 2;14(2):353. doi: 10.3390/pharmaceutics14020353
 27. Della Puppa A, Lombardi G, Rossetto M, Rustemi O, Berti F, Cecchin D, Gardiman MP, Rolma G, Persano L, Zagonel V, Scienza R. Outcome of patients affected by newly diagnosed glioblastoma undergoing surgery assisted by 5-aminolevulinic acid guided resection followed by BCNU wafers implantation: a 3-year follow-up. *J Neurooncol*. 2017 Jan;131(2):331-340. doi: 10.1007/s11060-016-2301-z
 28. Zavadskaya TS. Photodynamic therapy in the treatment of glioma. *Experimental oncology*. 2015; Dec;37(4):234-41.
 29. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5479494, Chlorin e6.
 30. Pedachenko E, Liubich L, Staino L, Egorova D. Dynamics of morphological changes in neural cell culture with a model of neurotrauma under the influence of conditioned media of the rat fetal brain neurogenic cells. *Cell Organ Transpl*. 2020; 8(2):177-186. doi:10.22494/cot.v8i2.114
 31. U-251 MG (formerly known as U-373 MG) (ECACC 09063001). Culture Collections. UK Health Security Agency; 2023.
 32. Ройко НВ, Филенко БМ, Ніколенко ДЄ, Мамай ІО. Патологія мітозів при пухлинах різної локалізації. *Світ медицини та біології*. 2013;9(2-2 (38)):217-9.