

Ukr Neurosurg J. 2024;30(3):38-51
doi: 10.25305/unj.306363

Порівняння ефектів фотодинамічного впливу із застосуванням хлорину Е6 на клітини гліобластоми лінії U251 та нирки ембріону людини лінії НЕК293 *in vitro*

В.Д. Розуменко ¹, Л.Д. Любич ², Л.П. Стайно ², Д.М. Єгорова ², А.В. Дащаківський ¹, В.В. Васлович ³, Т.А. Малишева ³

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

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

³ Відділ нейропатоморфології, Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Надійшла до редакції 17.06.2024
Прийнята до публікації 17.07.2024

Адреса для листування:

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

Злоякісні гліоми головного мозку є глобальною медичною і соціальною проблемою з тенденцією до неухильного зростання показників захворюваності та смертності. Методом, що дає змогу візуально ідентифікувати пухлинну тканину та водночас вибірково її зруйнувати, є фотодинамічна терапія, що передбачає введення фотосенсибілізатора (ФС) з подальшою його активацією за певної довжини світлової хвилі. Селективність накопичення ФС у пухлинній тканині злоякісної гліоми – одне з ключових питань для підвищення ефективності фотодинамічної терапії.

Мета: порівняти ефекти фотодинамічного впливу із застосуванням ФС хлорину Е6 на клітини гліобластоми (ГБ) людини лінії U251 та немалігнізовані клітини нирки ембріона людини лінії НЕК293.

Матеріали і методи. Сформовано групи клітинних культур залежно від умов культивування та екзогенного впливу: 1) контрольні – культивовані в стандартному поживному середовищі (модифікованому середовищі Ігла (Modified Eagle's Medium (MEM)) із L-глутаміном, 1 ммоль пірувату натрію, 10% фетальної телячої сироватки) та дослідні: 2) культивовані за умов додавання хлорину Е6 (концентрації 1,0 та 2,0 мкг/мл); 3) культивовані на поживному середовищі без додавання ФС та піддані лазерному опроміненню (ЛО) ($\lambda=660$ нм, потужність – 0,4–0,6 Вт, доза – 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим); 4) культивовані за умов додавання хлорину Е6 та впливу ЛО (потужність – 0,4–0,6 Вт, доза – 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим). Після впливу зазначених експериментальних чинників проводили динамічне спостереження з мікрофторесценцією впродовж 24 год і мікроскопічні та мікрометричні дослідження (кількість життєздатних клітин, загальна кількість клітин, мітотичний індекс (MI,%)).

Результати. Фотосенсибілізатор хлорин Е6 інкорпорується в цитоплазму клітин ліній U251 та НЕК293, інтенсивність флуоресценції є порівняною. За впливу хлорину Е6 (1,0 та 2,0 мкг/мл) дозозалежно підсилюються цитодеструктивні й антимітотичні ефекти в культурі клітин ГБ людини лінії U251. Цитодеструктивний ефект хлорину Е6 на культурі клітин лінії НЕК293 менш виразний, але антимітотичний ефект є порівняним в обох типах культур клітин. За впливу ЛО дозозалежно зростають цитодеструктивні та антимітотичні ефекти в культурі клітин ГБ людини лінії U251. Рівень цитодеструктивних й антимітотичних ефектів суттєво менший у культурах непухлинних клітин лінії НЕК293. Найбільш значуще зменшення мітотичної активності клітин ГБ людини лінії U251 (~100%) зафіксовано при найменшій дозі ЛО 25 Дж/см², потужності 0,6 Вт в імпульсному режимі, для клітин лінії НЕК293 (~80%) – при ЛО потужністю 0,6 Вт, доза 75 Дж/см² у безперервному режимі. За поєднаного впливу хлорину Е6 (1 і 2 мкг/мл, попередня інкубація 4 год) та ЛО в різних режимах дозозалежно знижується життєздатність пухлинних клітин лінії U251. Найменшою дозою ЛО для досягнення максимального цитотоксичного ефекту є 25 Дж/см², потужність 0,6 Вт в імпульсному режимі при застосуванні хлорину Е6 у концентрації 2 мкг/мл. Зазначені характеристики фотодинамічного впливу не спричиняють незворотних ефектів у культурах клітин лінії НЕК293 (референтні клітини).

Висновки. Установлено ефективний режим фотодинамічного впливу для досягнення цитодеструктивного й антимітотичного ефекту в культурі клітин ГБ людини лінії U251, що є відносно безпечним для немалігнізованих клітин: поєднане застосування дози ЛО 25 Дж/см², потужність 0,6 Вт в імпульсному режимі при попередній інкубації культури клітин із хлорином Е6 у концентрації 2 мкг/мл упродовж 4 год.

Ключові слова: лазерне опромінення; фотосенсибілізатор; злоякісні гліоми; гліобластома; U251; НЕК293; мітотичний індекс

Copyright © 2024 В.Д. Розуменко, Л.Д. Любич, Л.П. Стайно, Д.М. Єгорова, А.В. Дащаківський, В.В. Васлович, Т.А. Малишева



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

Вступ

Лікування злоякісних гліом (ЗГ) залишається серйозним викликом у світовому масштабі, незважаючи на дослідження причин їх виникнення і механізмів прогресування. Злоякісні новоутворення головного мозку є глобальною медичною і соціальною проблемою з тенденцією до зростання показників захворюваності та смертності (насамперед через прогресування ЗГ) [1–5]. При застосуванні традиційних хірургічних підходів з візуалізацією «ad oculus» пухлинні клітини в зоні інвазивного поширення, які мігрують на значні відстані, можуть залишитися поза увагою, внаслідок цього рецидив ЗГ виникає поблизу крайової (перифокальної) ділянки хірургічної порожнини [6]. Крім того, у функціонально важливих зонах головного мозку «радикальність» хірургічного видалення пухлини неможлива. Методом, що дає змогу максимально чітко (об'єктивно) візуально інтраопераційно ідентифікувати пухлинну тканину та водночас прицільно її руйнувати, є фотодинамічна терапія (ФДТ) – двохетапний процес, що передбачає введення світлочутливого хімічного агента (фотосенсибілізатора (ФС)) з подальшою інтраопераційною його активацією за певної довжини світлової хвилі [6, 7].

Принцип ФДТ ґрунтується на цитотоксичних ефектах, спричинених генерацією активованим ФС синглетного молекулярного кисню та вільних радикалів, які запускають у клітинах пухлини фотохімічні реакції з руйнуванням базових протеїнів цитоскелета. Вважається, що пухлинна тканина має до ФС вищу спорідненість, а ФС селективно інкорпорується в клітини новоутворення [8, 9]. Одночасне застосування хірургії під контролем флуоресценції та ФДТ дає змогу як візуалізувати пухлинні клітини, так і прицільно їх знищувати [9–11], оптимізує визначення меж поширення пухлини для максимального її видалення [12].

Аналіз відомостей щодо клінічних випробувань засвідчує, що застосування ФДТ як додаткового методу лікування ЗГ одразу після максимальної резекції є безпечним, знижує ризик рецидиву завдяки таргетуванню залишкових пухлинних клітин у порожнині резекції, поліпшує виживаність і якість життя пацієнтів [10, 13–21]. Відсутність інформації про розвиток резистентності до численних сеансів ФДТ припускає можливість повторної обробки пухлинних клітин, не видалених під час операції.

Оскільки ефективність фотодинамічного ушкодження сенсibilізованої клітини визначається внутрішньоклітинною концентрацією ФС, його локалізацією в клітині, фотохімічною активністю, а також дозою лазерного опромінення (ЛО), актуальним завданням є розробка експериментальних моделей *in vitro* для оцінки ефективності схем ФДТ. Фотосенсибілізатори мають долати гематоенцефалічний бар'єр, вибірково локалізуватися в пухлинній тканині без одночасного накопичення в значних концентраціях у здорових тканинах, володіти максимальною цитотоксичною активністю щодо пухлинних клітин, швидко виводитися з організму [22, 23]. При дослідженні ФС основну увагу зосереджують на сполуках природного походження, однією з яких є хлорин Е6 – ФС 2-го покоління,

представник природних пігментів, які отримують із зелених водоростей. Хлорин Е6 поєднано з полівінілпіролідом (біосумісним полімером, який надає водорозчинності гідрофобному хлорину Е6), що сприяє накопиченню в пухлині завдяки підвищеній проникності дефектних пухлинних судин і зменшеному лімфодренажу [24]. Селективність накопичення ФС у пухлинній тканині ЗГ – одне з ключових питань для підвищення ефективності ФДТ.

Мета: порівняти ефекти фотодинамічного впливу із застосуванням ФС хлорину Е6 на клітини гліобластоми людини лінії U251 та немалігнізовані клітини нирки ембріона людини лінії НЕК293.

Матеріали і методи

Дослідження проведено на культурах клітин гліобластоми (ГБ) людини лінії U251 та клітин нирки ембріона людини лінії НЕК293. Кріоконсервовані зразки клітин (люб'язно надані «Клітинним банком ліній тканин людини та тварин», Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, Київ) розморожували на водяній бані впродовж 30 хв за температури 38 °С, суспендували в 10 мл модифікованого середовища Ігла (Modified Eagle's Medium (MEM)) із L-глутаміном (Biowest, Франція) без сироватки та центрифугували (5 хв при 1000 об/хв, MICROmed CM-3), осад клітин суспендували в середовищі MEM із L-глутаміном (1 ммоль пірватату натрію, 10% фетальної телячої сироватки (Biowest, Франція) і поміщали в культуральні пластикові флакони (25 см³, Cellstar, Німеччина) у кількості $0,1 \cdot 10^6$ клітин/8 мл поживного середовища. Культури тримали в CO₂-інкубаторі (Nuve, Туреччина) у стандартних умовах (95% вологості, 37 °С, 5% CO₂). Зміну поживного середовища здійснювали кожні три доби. Динамічне спостереження з мікрофотореєстрацією проводили за допомогою інвертованого мікроскопа «Nikon S-100» (Японія).

Клітини в кількості $2 \cdot 10^6$ переносили в пластикові чашки Петрі (d=35 мм, Sarstedt, Німеччина) на покривні скельця, попередньо вкриті поліетиленіном (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 зі сформованим моношаром додавали ФС у концентрації 1 або 2 мкг/мл. Для дослідження безпосередніх ефектів ЛО чашки з культурами розміщували під вертикальним оптоволоконним лазерним виводом (h=5 см) приладу «LIKA-surgeon» («Фотоніка-Плюс», Україна) та піддавали опроміненню з рівномірним охопленням площі моношару світловими променями (λ – 660 нм) за різних режимів (діапазон потужності – 0,4–0,6 Вт, доза (експозиція - поверхнева щільність енергії випромінювання щодо площі опромінюваної поверхні) – 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим). Час впливу ЛО на культури клітин залежав від застосованої потужності та режиму (максимальна тривалість опромінення становила 240 с для ЛО 0,6 Вт, 75 Дж/см², імпульсний режим). Опромінювані культури у цей час утримували при кімнатній температурі, культури груп порівняння – за

аналогічних умов. Для дослідження поєданого впливу хлорину Е6 і ЛО в культурі клітин зі сформованим моношаром додавали ФС (у концентраціях 1 та 2 мкг/мл) і тримали в CO₂-інкубаторі (Nuve, Туреччина) упродовж 4 год, після чого культури піддавали опроміненню за різних режимів, як зазначено вище. Варіанти комбінацій експериментального впливу на культури клітин наведено в **Таблиці**.

Після впливу зазначених експериментальних чинників культури тримали в CO₂-інкубаторі (Nuve, Туреччина) та проводили динамічне спостереження з мікрофотореєстрацією за допомогою інвертованого

мікроскопа «Nikon S-100» (Японія) упродовж 24 год, мікрофотореєстрацію флуоресценції – за допомогою мікроскопа Ахіорфот (Opton, Німеччина) із використанням флуоресцентних фільтрів (λ – [500–680] нм).

Для визначення цитотоксичного впливу хлорину Е6 та ЛО культури клітин піддавали впливу різних дослідних умов з додаванням у культивуванні середовище вітального барвника (0,2% розчин трипанового синього (Merck, Німеччина) та проводили спостереження за ростом культур за допомогою інвертованого мікроскопа впродовж 24 год.

Таблиця. Умови експериментального впливу на культури клітин

№	Умови впливу			Кількість культур клітин			
				U251	HEK293		
1	Контроль			10	9		
2	Хлорин Е6			1,0 мкг/мл	9	13	
				2,0 мкг/мл	10	14	
3	Лазерне опромінення (ЛО)	0,4 Вт	10 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
			25 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
		0,6 Вт	10 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
			25 Дж/см ²	безперервний режим	7	3	
				імпульсний режим	7	3	
			50 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
			75 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
4	Хлорин Е6 (1 мкг/мл) + ЛО	0,4 Вт	10 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
			25 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
		0,6 Вт	10 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
			25 Дж/см ²	безперервний режим	3	3	
				імпульсний режим	3	3	
		Хлорин Е6 (2 мкг/мл) + ЛО	0,4 Вт	10 Дж/см ²	безперервний режим	3	3
					імпульсний режим	3	3
				25 Дж/см ²	безперервний режим	3	3
					імпульсний режим	3	3
0,6 Вт	10 Дж/см ²		безперервний режим	3	3		
			імпульсний режим	3	3		
	25 Дж/см ²		безперервний режим	7	3		
			імпульсний режим	7	3		
50 Дж/см ²	безперервний режим	3	3				
	імпульсний режим	3	3				
75 Дж/см ²	безперервний режим	3	3				
	імпульсний режим	3	3				

Для подальшого аналізу сформовано групи клітинних культур залежно від умов культивування та екзогенного впливу: 1) контрольні – культивовані в стандартному поживному середовищі (MEM із L-глутаміном, 1 ммоль пірувату натрію, 10% фетальної телячої сироватки) та дослідні: 2) культивовані за умов додавання хлорину Е6 (концентрації 1,0 та 2,0 мкг/мл); 3) культивовані на поживному середовищі без додавання ФС та піддані ЛО (інтенсивність – 0,4–0,6 Вт, доза – 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим); 4) культивовані за умов додавання хлорину Е6 та впливу ЛО (інтенсивність – 0,4–0,6 Вт, доза – 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим).

Культури клітин фіксували в 10% нейтральному формаліні (Bio-Optica, Італія) і забарвлювали гематоксиліном та еозином за Караччі. Мікроскопічне дослідження та фотореєстрацію цитологічних препаратів культур здійснювали за допомогою світлооптичного фотомікроскопа «Nikon Eclipse E200» (Японія). У кожному препараті аналізували особливості будови дослідних культур порівняно з контрольними. Визначали форму клітин, наявність і розгалуженість відростків, структуру та характер розподілу хроматину, форму ядер, особливості міжклітинних взаємодій.

Кількісні дослідження дослідних культур порівняно з контролем проводили в 10 репрезентативних полях зору зі стандартною вимірювальною шкалою (об'єкт-мікромір). Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою обробки цифрових зображень культур у 10 довільно обраних полях зору (0,04 мм²) для кожного зразка при однаковому збільшенні (800) за допомогою програмного забезпечення ImageView software (2020). На тестовій площі визначали кількість життєздатних клітин, загальну кількість клітин, кількість клітин у стані мітотичного поділу. Мітотичний індекс (MI,%) розраховували як частку клітин із наявністю мітозів на 100 клітин.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням ліцензованого пакета статистичних програм (програмне забезпечення StatSoft Inc., 2022). Нормальність розподілу даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. 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). Дані представлено на одиницю тестової площі (0,04 мм²) у вигляді ($M \pm m$), де M – середнє арифметичне значення, m – стандартне відхилення від середнього арифметичного значення. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Як модель ЗГ *in vitro* використано культури клітин ГБ людини лінії U251, отриманої зі злоякісної пухлини ГБ головного мозку людини методом експлантації, клітинний тип пухлини визначено як плеоморфний/астроцитоїдний [25].

Клітини ГБ людини лінії U251 у культурі відтворювали типову динаміку росту: від утворення ланцюжків та щільних моношарових клітинних конгломератів поряд з окремими клітинами без виразних ознак диференціації (з вузькою цитоплазмою

та помірним поліморфізмом ядер) та клітинами астроцитарної будови з відростками упродовж 1-ї доби після експлантації (**Рис. 1А**) до розростання моношару пухлинних клітин (великого розміру з чіткими контурами, виразною цитоплазмою, великим ядром, астроцитарної будови, уніполярної, трикутної, ромбоподібної, полігональної форми з видовженими відростками) на 5-ту–7-му добу (**Рис. 1Б**). На етапі конфлуентного росту в культурах спостерігали ретикулярні розростання щільно укомплектованих пухлинних клітин із високим поліморфізмом. На гістологічних препаратах у зоні росту культур у полі зору визначалися 2-3 пухлинні клітини в стадії мітотичного поділу (**Рис. 1В**). На 7-му добу культивування в контрольних культурах клітин лінії U251 у зонах росту недиференційованих пухлинних клітин MI в середньому становив $(0,88 \pm 0,05)\%$.

Для порівняння ефективності фотодинамічного впливу на непухлинні тканини використали клітини лінії HEK293 – іморталізованої лінії, штучно створеної за допомогою трансформації культури клітин нирки ембріона людини фрагментами ДНК аденовірусу 5 [26]. Клітини HEK293 мають епітеліоподібну будову, утворюють моношарові культури. Зазвичай вони мають сплюснену видовжену форму з чіткими обрисами меж клітин з високою адгезією. HEK293 не експресують тканиноспецифічні гени, але експресують маркери ниркових клітин-попередників, нейрональних клітин і надниркових залоз [27]. Наявність специфічних генних продуктів та мРНК, які зазвичай виявляються в нейронах, потенціал до індукованого синаптогенезу, функціональності ендогенних нейронспецифічних потенціалзалежних каналів і відповіді на різноманітні агоністи, що беруть участь у передачі сигналів нейронів, дають підставу розглядати HEK293 як клітини з фенотипом, подібним до нейронального [27]. Клітини HEK293 мають складний фенотип, зумовлений гетерогенним нестабільним атипичним каріотипом: вони мають дві або більше копії кожної хромосоми, з модальним числом хромосом 64 – гіпотриплоїдний каріотип (такий що містить більшу ніж удвічі (диплоїд), але меншу ніж утричі (триплоїд) кількість хромосом; три копії X-хромосоми і чотири копії хромосом 17 і 22) [28]. Середнє число хромосом і хромосомні аберації відрізняються в клітинах HEK293 та їх похідних, а також у HEK293-клітинах із різних клітинних банків/лабораторій [27].

У наших дослідженнях у перші 24 год спостерігали прикріплену до поверхні популяцію невеликих, здебільшого злегка округлої форми клітин, що росли дисперсно, а також незначну кількість клітин полігональної та виразно видовженої форми (**Рис. 2А**).

При культивуванні впродовж 5–7 діб клітини лінії HEK293 формували суцільний моношар епітеліоподібної структури, розташовувалися досить щільно, з великою кількістю міжклітинних контактів. Серед клітин переважали правильні рівновісні форми, серед яких зрідка спостерігали округлі, циліндричні та полігональні форми. Клітини мали щільну цитоплазму та розташоване центрично велике овально-округле ядро, яке містило 1-2 (зрідка 3) ядерця (**Рис. 2Б**). Спостерігали значну кількість проліферативно активних клітин (**Рис. 2Г**). На 7-му добу культивування в контрольних культурах клітин лінії HEK293 у зонах росту MI в середньому становив $(0,61 \pm 0,07)\%$. У тесті з трипановим синім відзначали незначну частку спонтанно дегенерованих клітин (**Рис. 2В**).

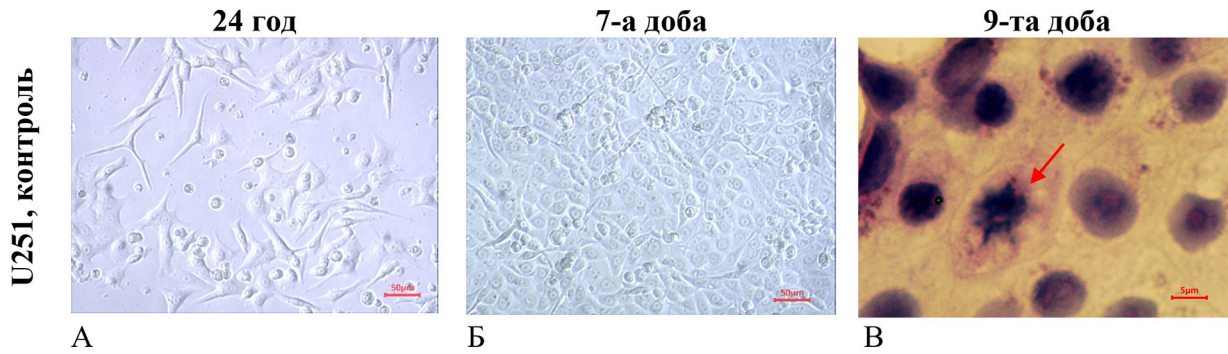


Рис. 1. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251, культивованих у стандартному поживному середовищі (контроль). Світлова мікроскопія, незабарвлена культура (А, Б); забарвлення гематоксиліном та еозином (В). Стрілкою позначено клітину в стадії мітозу (профаза)

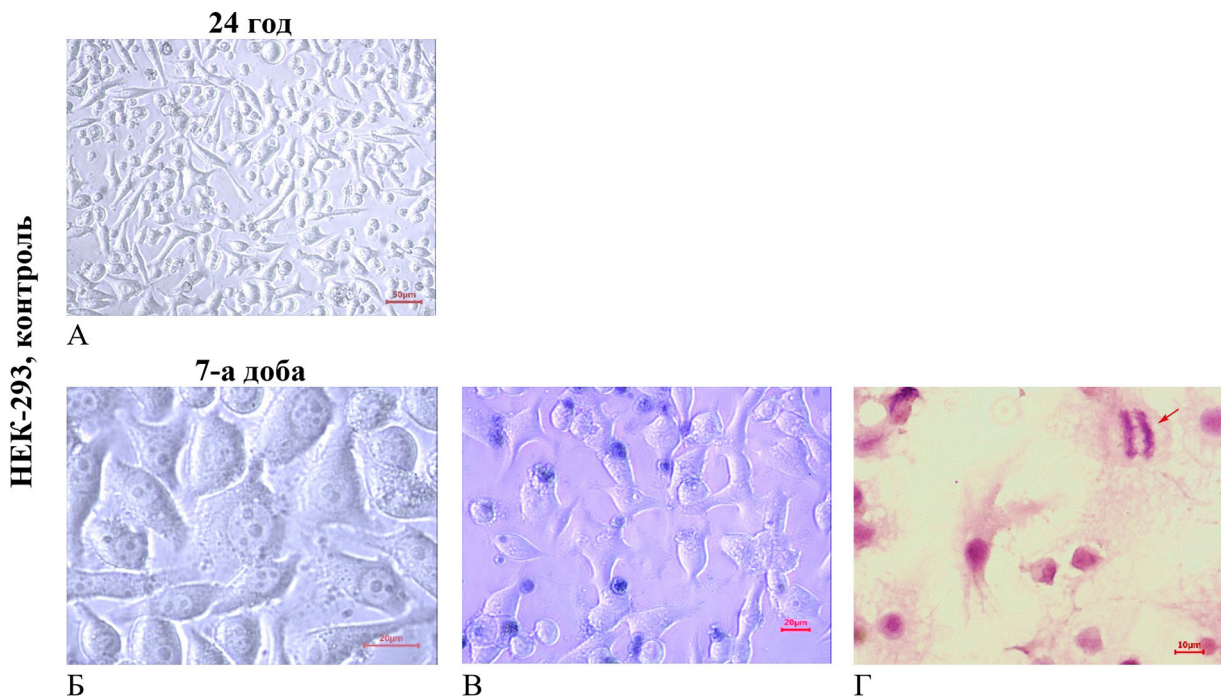


Рис. 2. Мікрофото культур клітин лінії HEK293, культивованих у стандартному поживному середовищі (контроль). Світлова мікроскопія, незабарвлена культура (А, Б); забарвлення вітальним барвником трипановим синім (В); забарвлення гематоксиліном та еозином (Г). Стрілкою позначено клітину в стадії мітозу (анафаза)

Ефекти хлорину Е6 у культурах клітин ліній U251 та HEK293. Після застосування хлорину Е6 у концентрації 1 мкг/мл через 24 год у культурах клітин лінії U251 спостерігали розрідження зони росту з появою великих лакун у клітинному моношарі (Рис. 3А). На тлі неушкоджених клітин виявляли дифузно розташовані дистрофовані або некробіотично змінені пухлинні клітини з редукцією відростків із заокругленою цитоплазмою з ознаками ліпідної та гідропічної дистрофії, що прогресує, та гіперхромними ядрами. Деякі пухлинні клітини перетворилися на клітини-тіні або «голі» ядра, з утворенням невеликих скупчень. Кількість клітин у мітотичному стані зменшувалась до 1-2 у полі зору (МІ у середньому становив $(0,71 \pm 0,08)\%$, $p=0,14$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні). Відзначали наявність блокованих

форм К-мітозів серед фігур мітотичного поділу пухлинних клітин.

За збільшеної концентрації хлорину Е6 (2 мкг/мл) вже через 6 год відзначали розрідження клітинних масивів культур U251 за рахунок ретракції зони росту та редукції відростків у пошкоджених клітинах. Через 24 год втрачалася міжклітинна адгезія, що призводило до появи малих і великих лакун у моношарі клітин зони росту, розрідження клітинних масивів та десквамації частки загиблих клітин. На деяких ділянках зона росту клітин U251 була майже повністю спустошеною з невеликою кількістю дегенерованих клітин округлої форми. Збереженими залишалися окремі ділянки ретикулоподібних структур із клітинами з ознаками дегенерації (вакуолізацією цитоплазми і втратою відростків)

(Рис. 3А). На збережених ділянках моношару зони росту зберігалася мітотична активність окремих пухлинних клітин (спостерігали 1 клітину в стані мітозу на декілька полів зору, МІ зменшувався до $(0,15 \pm 0,02)\%$, $p=1 \cdot 10^{-5}$ порівняно з контролем, $p=0,04$ порівняно з показником за впливу хлорину Е6 (1 мкг/мл), U-тест Манна-Уїтні) **(Рис. 4).**

На відміну від клітин лінії U251 зона росту клітин лінії НЕК293 через 24 год впливу хлорину Е6 у концентрації 1 мкг/мл залишалася неушкодженою: щільність клітин була високою, але в клітинах були наявні патологічні зміни (редукція відростків, округлення цитоплазми, зміщення ядер на периферію цитоплазми, її вакуолізація) **(Рис. 3В).** Клітини НЕК293 зберігали низький рівень мітотичної активності (МІ в середньому становив $(0,33 \pm 0,04)\%$, $p=0,04$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні). Збільшення концентрації хлорину Е6 до 2 мкг/мл майже не впливало на щільність моношару клітин НЕК293, але зростала кількість округлих клітин з редукованими відростками, вакуолізованою цитоплазмою та децентрованими ядрами **(Рис. 3В).** У зоні росту виявляли окремі мітотично активні клітини (МІ зменшувався до $(0,23 \pm 0,03)\%$ **(Рис. 4)**, $p=0,01$ порівняно з контролем, $p=0,6$ порівняно з показником за впливу хлорину Е6 (1 мкг/мл), U-тест Манна-Уїтні), серед яких спостерігали патологічні форми (асиметричні мітози), що призводили до порушення телофази, наслідком чого була поява в моношарі двоядерних та багатоядерних клітин.

За даними флуоресцентного дослідження, у дослідних культурах клітин ліній U251 та НЕК293 хлорин Е6 накопичувався в цитоплазмі, інтенсивність флуоресценції в різних типах клітин майже не відрізнялася **(Рис. 3Б, 3Г)**, що, імовірно, пов'язано з особливостями гетерогенного фенотипу клітин лінії НЕК293 [27]. Про локалізацію ФС в органелах цитоплазми повідомляли також інші автори [29].

На відміну від клітин ліній U251 та НЕК293 інтенсивність флуоресценції хлорину Е6, інкорпорованого немалігнізованими клітинами головного мозку щурів (E14-16), була набагато слабшою [30], що узгоджується з даними щодо більшої спорідненості та вибіркової накопичення ФС пухлинною тканиною [22].

Таким чином, результати тестування впливу хлорину Е6 засвідчують дозозалежний цитотоксичний ефект на пухлинні клітини лінії U251. На відміну від клітин лінії U251 культури клітин лінії НЕК293 не зазнають такої руйнації зони росту за впливу хлорину Е6, клітини в них здебільшого залишаються збереженими, але антимітотичний ефект хлорину Е6 є відносно порівняним в обох типах культур клітин.

Ефекти лазерного опромінення за різних режимів у культурах клітин ліній U251 та НЕК293.

За впливу ЛО (потужність 0,4 Вт, доза 10 Дж/см², безперервний режим) через 24 год у культурі клітин лінії U251 спостерігали ретракцію зони росту з утворенням лакун різної величини та ущільнення моношару пухлинних клітин **(Рис. 5А).** Натомість у культурах клітин лінії НЕК293 за тих самих умов не відзначали суттєвого порушення моношару клітин, клітини мали характерні розміри та форму **(Рис. 5В).** За впливу ЛО (0,4 Вт, 10 Дж/см²) в імпульсному режимі додаткових змін порівняно з попередніми спостереженнями в обох досліджуваних лініях клітин не виявлено **(Рис. 5Б).**

За впливу ЛО (0,4 Вт, 25 Дж/см², безперервний режим) відбувалася подальша ретракція зони росту в культурах клітин лінії U251 зі збереженням неушкоджених ділянок моношару **(Рис. 5А).** У культурах клітин лінії НЕК293 пошкоджені зони росту за цих умов не зафіксовано, тест із трипановим синім виявив невелику кількість дегенерованих клітин **(Рис. 5В).** За впливу ЛО (0,4 Вт, 25 Дж/см²) в імпульсному режимі відбувалося ще більше ущільнення моношару клітин лінії U251, збільшення лакун у зоні росту та кількості дегенерованих клітин **(Рис. 5Б)**, значне зниження мітотичної активності **(Рис. 6А;** $p=3 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, $p=0,007$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні). У культурах клітин лінії НЕК293 за тих самих умов не спостерігали суттєвих змін **(Рис. 6Б, 6Г).**

За впливу ЛО більшої потужності (0,6 Вт, 10 Дж/см², безперервний режим) у культурах клітин лінії U251 спостерігали істотне зменшення загальної кількості клітин у моношарі, більшість клітин округлювались, втрачали міжклітинні контакти, що призводило до спустошення зони росту **(Рис. 5А).** Водночас моношар клітин лінії НЕК293 не зазнавав значних змін **(Рис. 5В).** ЛО (0,6 Вт, 10 Дж/см²) в імпульсному режимі призводило до руйнації зони росту клітин лінії U251: у більшості клітин були редуковані відростки, клітини втрачали контакти між собою та поверхнею, що призводило до деградації моношару з утворенням неформованих клітинних агрегатів та фрагментів **(Рис. 6Б).** Мітотична активність клітин лінії U251 була на низькому рівні **(Рис. 6А;** $p=1 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні). У культурах клітин лінії НЕК293 за тих самих умов відзначали появу патологічно змінених клітин (із втратою характерної форми та округленням), спостерігали двоядерні клітини та зміщення ядер на периферію цитоплазми **(Рис. 5Г).** Мітотична активність клітин лінії НЕК293 майже не змінювалася **(Рис. 6Б)**, щільність клітин у моношарі дещо зменшувалася порівняно з контролем.

За впливу ЛО (0,6 Вт, 25 Дж/см², безперервний режим) також істотно зменшувалася загальна кількість клітин лінії U251 у зруйнованій зоні росту, спостерігали великі ділянки без клітин або з невеликою кількістю клітин на різних стадіях дегенерації **(Рис. 5А).** У культурах клітин лінії НЕК293 за тих самих умов зміщення ядер на периферію цитоплазми спостерігали в більшій частині клітин, зростала чисельність округлих клітин без втрати щільності моношару та загальної кількості клітин у зоні росту **(Рис. 5В).** ЛО (0,6 Вт, 25 Дж/см²) в імпульсному режимі підсилювало деструктивні процеси в культурах клітин лінії U251 **(Рис. 5Б)** та практично нівелювало мітотичну активність **(Рис. 6А;** $p=3 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, $p=0,34$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні). У культурах клітин лінії НЕК293 за цих самих умов не спостерігали значних пошкоджень клітинного масиву, щільність моношару залишалася високою, але зростала кількість округлих дегенерованих клітин **(Рис. 5Г)** та значуще знижувалися показники мітотичної активності **(Рис. 6Б;** $p=0,02$ порівняно з контролем, $p=0,27$ порівняно з показником безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні).

Збільшення дози ЛО до 50 Дж/см² у безперервному режимі з потужністю 0,6 Вт призвело до зростання дистрофічних і некробіотичних змін у клітинах лінії U251, появи значної кількості апоптичних тілець (**Рис. 5А**). За тих самих умов ЛО (0,6 Вт, 50 Дж/см²) в імпульсному режимі спричинило підсилення руйнівних процесів у зоні росту клітин лінії U251 (**Рис. 5Б**). Некробіотичні процеси спонтанної загибелі клітин охопили більшість клітин зони росту, МІ значуще знизився ($p=1 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем,

$p=0,55$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні). У культурах клітин лінії HEK293 ЛО за тих самих режимів спричинило зменшення порівняно з контрольними культурами щільності клітин у моношаровій зоні росту ($p<0,05$, U-тест Манна-Уїтні, **Рис. 6Б**), клітини зберігали характерну форму, але спостерігали клітини з утворенням вакуолей у цитоплазмі (**Рис. 5В, 5Г**), мітотична активність суттєво знижувалася ($p=0,03$, $p=0,04$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні).

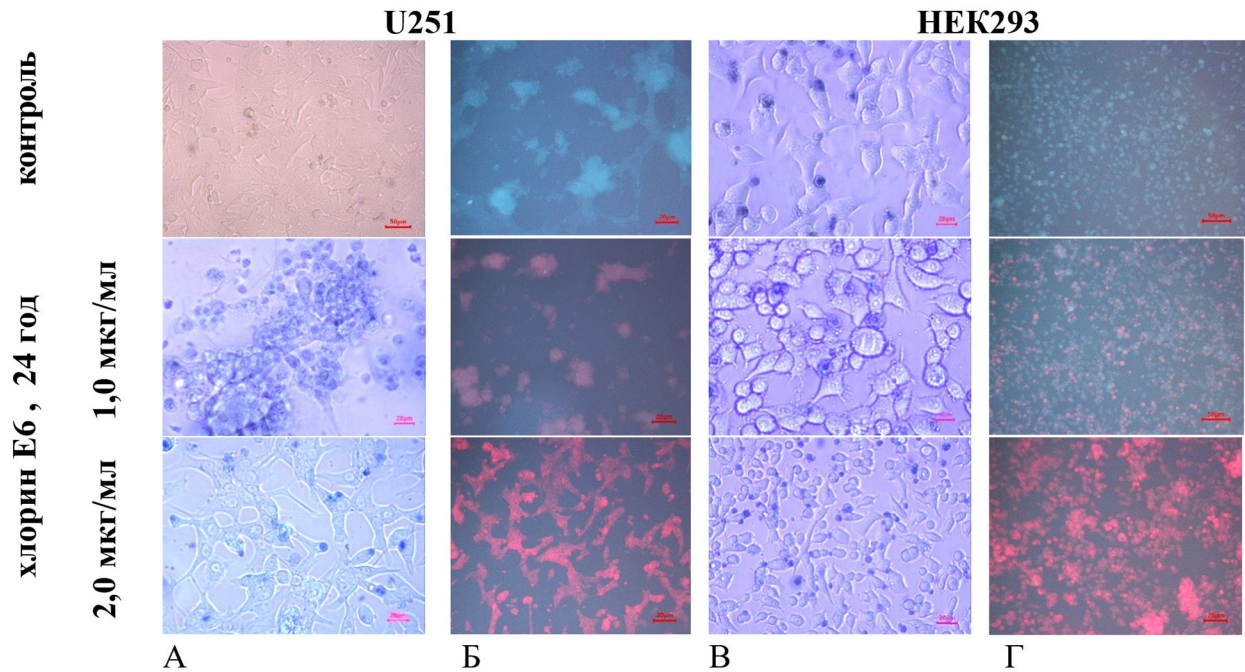


Рис. 3. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251 та клітин лінії HEK293, культивованих у стандартному поживному середовищі та після додавання хлорину Е6 у різній концентрації. Світлова (А, В) та флуоресцентна (Б, Г) мікроскопія. Забарвлення вітальним барвником трипановим синім

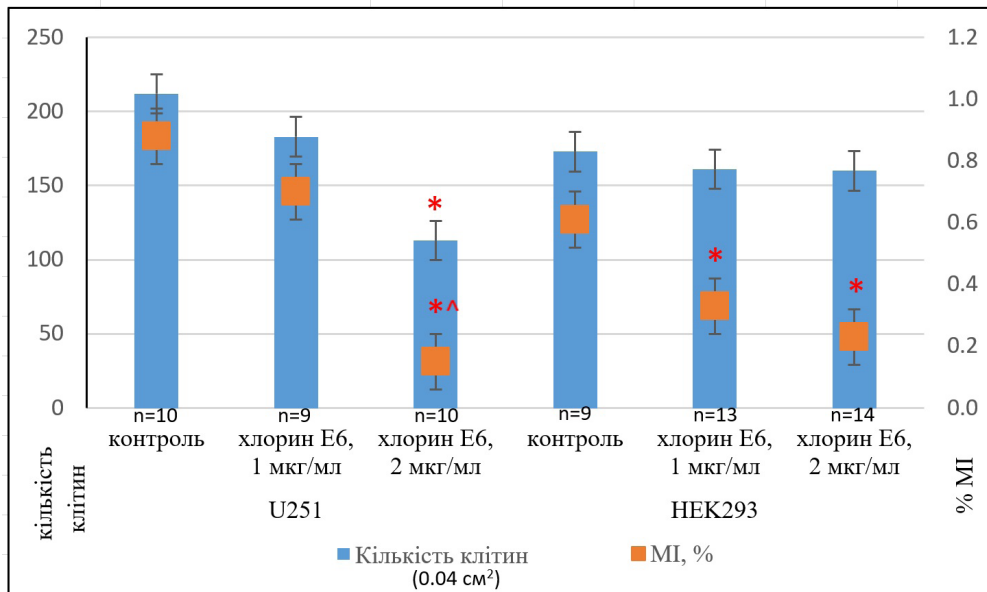


Рис. 4. Середня кількість клітин і мітотичний індекс (МІ,%) у культурах клітин гліобластоми людини лінії U251 та клітин лінії HEK293 через 24 год після додавання хлорину Е6 у різній концентрації: * – $p<0,05$ порівняно з контролем; ^ – $p<0,05$ порівняно з хлорином Е6 (1 мкг/мл); U-тест Манна-Уїтні

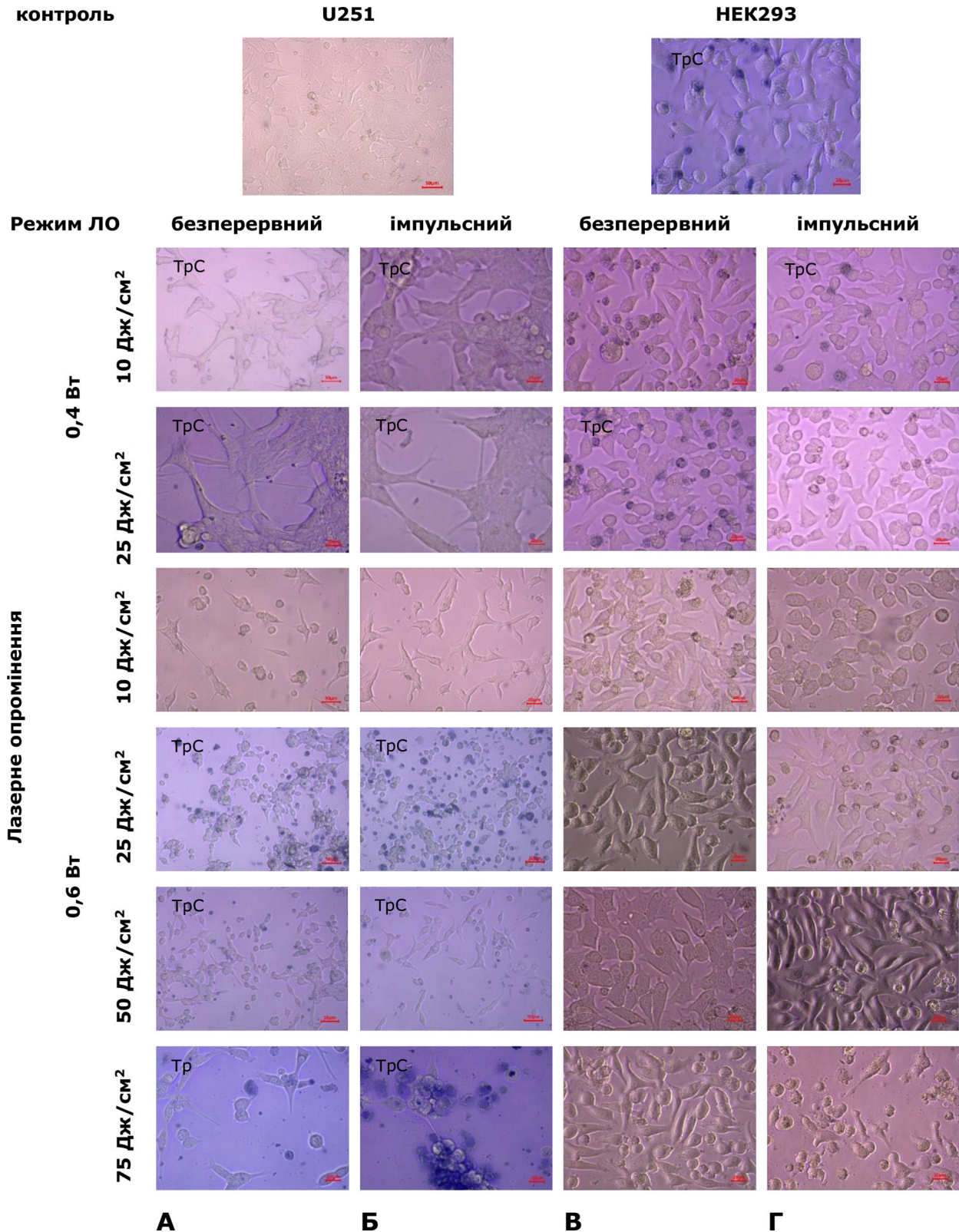


Рис. 5. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251 та клітин лінії HEK293 через 24 год після впливу лазерного опромінення в різних режимах. Світлова мікроскопія. Незабарвлені культури та забарвлення вітальним барвником трипановим синім (ТрС)

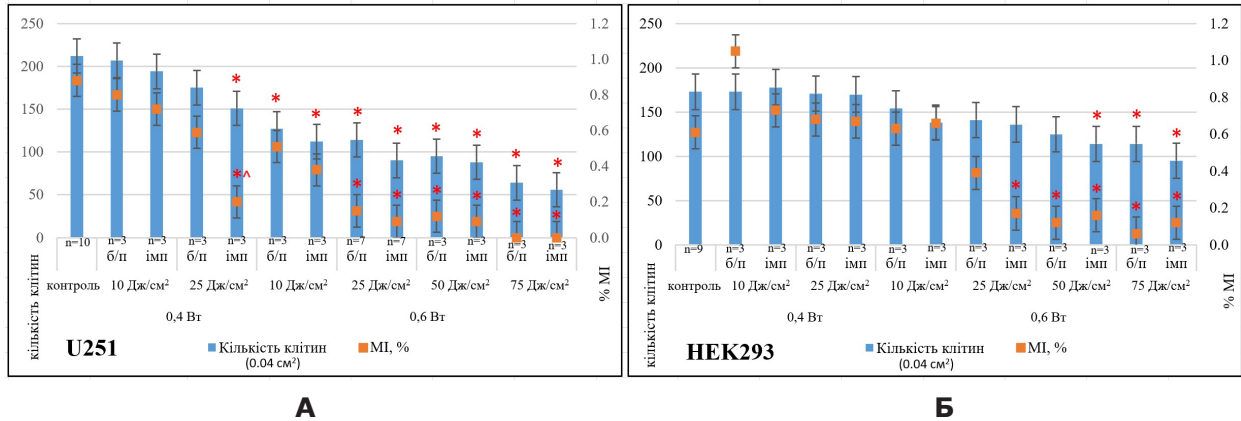


Рис. 6. Середня кількість клітин і мітотичний індекс (MI,%) у культурах клітин гліобластоми людини лінії U251(A) та клітин лінії HEK293 (Б) через 24 год після впливу лазерного опромінення в різних режимах: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ^ – $p < 0,05$ порівняно з безперервним режимом лазерного опромінення, U-тест Манна-Уїтні

Після впливу ЛО у дозі 75 Дж/см² (потужність 0,6 Вт) як у безперервному, так і в імпульсному режимі, у культурах клітин лінії U251 виявили збільшення руйнації зони росту та дистрофічних і некробіотичних змін у клітинах (Рис. 5А, 5Б). На деяких ділянках зона росту була повністю спустошена з майже субтотальним руйнуванням клітин. У частини клітин спостерігали коагуляцію хроматину з перетворенням на різко базофільну цитогенну масу (пікноз), що свідчило про порушення цілісності мембран. Мітотична активність майже зникла ($p = 1 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, $p = 0,41$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні). На цитологічних препаратах на збережених ділянках зони росту реєстрували збільшення частки патологічно змінених клітин із великою кількістю клітин-тіней і «голих ядер» на тлі різкого зменшення загальної кількості клітин (Рис. 6А).

У культурах клітин лінії HEK293 ЛО (0,6 Вт 75 Дж/см²) у безперервному режимі спричинило округлення та роз'єднання клітин у щільному моношарі, збільшення ядер, вакуолізацію цитоплазми, зниження адгезії клітин і, як наслідок, – порушення зони росту (Рис. 5Б). ЛО з такими самими параметрами в імпульсному режимі призвело до вакуолізації клітин лінії HEK293, втрати міжклітинних контактів, їх округлення та лізису, що зменшило щільність моношару (Рис. 5Г). Мітотична активність була на низькому рівні ($p = 0,01$ порівняно з контролем, $p = 0,58$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні; Рис. 6Б).

Отже, дослідження з тестування особливостей впливу ЛО на культури клітин ГБ людини лінії U251 свідчать про дозозалежний цитотоксичний ефект його дії. Збільшення потужності з 0,4 до 0,6 Вт і дози з 10 до 75 Дж/см² у безперервному режимі призводить до руйнівних змін в архітектоніці зони росту (від ретракції зони росту з утворенням лакун різного розміру за найнижчих показників ЛО до грубої руйнації архітектоніки і значного спустошення клітинних масивів за найвищих показників). Також відзначено поступове зниження мітотичної активності пухлинних клітин та накопичення в них некробіотичних змін аж до незворотної дегенерації з подальшою десквамацією

загиблих клітин. Такий ефект має тенденцію до підсилення за тих самих характеристик ЛО в імпульсному режимі, значуще відрізняючись за впливу ЛО 0,4 Вт, 25 Дж/см² ($p = 0,007$, U-тест Манна-Уїтні).

На відміну від пухлинних клітин лінії U251 ступінь впливу ЛО в застосованих режимах на непухлинні клітини лінії HEK293 був суттєво меншим: перші патологічні зміни клітин лінії HEK293 без змін зони росту виявляли, починаючи з ЛО потужністю 0,6 Вт (доза 10 Дж/см²) в імпульсному режимі, а суттєві зміни щільності моношару відбувалися за збільшення дози ЛО до 75 Дж/см² в імпульсному режимі.

За динамікою показника мітотичної активності виявлено, що найбільше його зниження в культурі клітин ГБ людини лінії U251 реєстрували, починаючи з ЛО потужністю 0,6 Вт (доза 25 Дж/см²). За такого самого режиму культури клітин лінії HEK293 зберігали мітотичну активність.

Найбільш значуще зменшення мітотичної активності клітин ГБ людини лінії U251 (~100%) зафіксовано при найменшій дозі ЛО 25 Дж/см², потужності 0,6 Вт в імпульсному режимі ($p = 3 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, $p = 0,34$ порівняно з безперервним режимом ЛО, U-тест Манна-Уїтні; Рис. 6А). Для клітин лінії HEK293 найбільш значуще зниження мітотичної активності (~80%) зафіксовано при ЛО потужністю 0,6 Вт (доза 75 Дж/см²) у безперервному режимі ($p = 0,01$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; Рис. 6Б).

Ефекти поєднаного впливу хлорину Е6 та лазерного опромінення за різних режимів у культурах клітин ГБ людини лінії U251 та клітин лінії HEK293. У культурах клітин лінії U251 після 24-годинної інкубації з хлорином Е6 (1 мкг/мл) та наступним ЛО (0,4 Вт, 10 Дж/см², безперервний та імпульсний режим) відбувалася ретракція зони росту та значне зменшення щільності клітинного моношару (Рис. 7А, 7Б). Клітини в зоні росту характеризувалися високою проникністю вітального барвника (трипанового синього) навіть в ядра, що свідчило про пошкодження цілісності мембран. За тих самих умов у культурах клітин лінії HEK293 також значно зменшувалася щільність клітинного моношару, частина клітин втрачали контакти одна з одною та з поверхнею, округлювалися (Рис. 7В, 7Г),

але лише частина клітин лінії НЕК293 (переважно округлі, некротизовані, флукутуючі) забарвлювалися трипановим синім. У клітинах лінії НЕК293 спостерігали накопичення ліпідних крапель у цитоплазмі, що зумовлювало клітинну цитотоксичність.

Подібні до описаних зміни в клітинах обох ліній спостерігали після 24-годинної інкубації з хлорином Е6 (1 мкг/мл) та наступним ЛО (0,4 Вт, 25 Дж/см², безперервний та імпульсний режим) (Рис. 7).

За впливу ЛО більшої потужності (0,6 Вт, 10 Дж/см², безперервний режим) у культурах клітин лінії U251 реєстрували різке спустошення зони росту, клітини дегенерували, округлювалися, втрачали відростки (Рис. 7А). У полі зору залишалися невеликі комплекси розпластаних клітин із відростками, які втратили характерні форми, серед них траплялися

2-ядерні та 3-ядерні. У зоні росту клітин лінії НЕК293 за тих самих умов також спостерігали поля спустошення, клітини втрачали контакти між собою та з поверхнею, що призводило до їх десквамації. У полі зору спостерігали велику кількість округлених клітин на різних стадіях дегенерації (Рис. 7Б).

За впливу ЛО (0,6 Вт, 10 Дж/см², імпульсний режим) у клітинах лінії U251 відбувалися дегенеративні зміни: втрата відростків, зниження адгезії, втрата характерних форм клітин, накопичення ліпідів у цитоплазмі. Зона росту спустошувалась, залишалися скупчення клітин із декількома ядрами та редукованими відростками (Рис. 7Б). Мітотична активність знижувалася ($p=1 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, $p=0,59$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні).

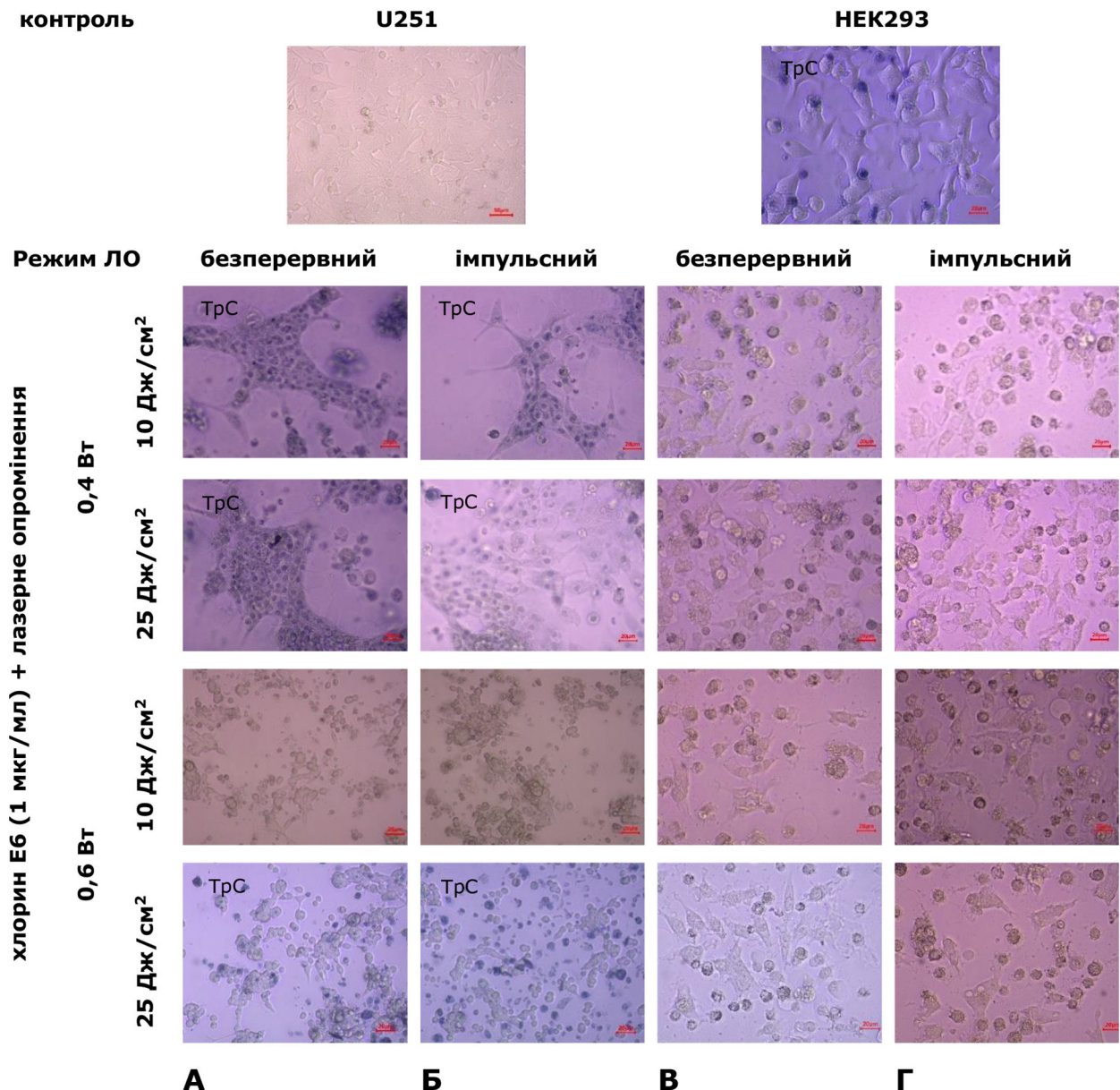


Рис. 7. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251 та клітин лінії НЕК293 за поєданого впливу хлорину Е6 (1 мкг/мл) і лазерного опромінення в різних режимах. Світлова мікроскопія. Незабарвлені культури та забарвлення вітальним барвником трипановим синім (TrC)

За тих самих умов клітинна щільність у зоні росту клітин лінії НЕК293 залишалася вищою, хоча вони зазнавали дегенеративних змін: накопичення ліпідів, вакуолізація цитоплазми, втрата характерних морфологічних рис, округлення, наявність декількох ядер (**Рис. 7Г**). Подібні зміни відбувалися в зоні росту культур клітин лінії НЕК293 при збільшенні дози ЛО до 25 Дж/см² (**Рис. 7В, 7Г**). В імпульсному режимі ЛО призводило до більшого спустошення зони росту та збільшення кількості дегенеративно змінених клітин порівняно з безперервним режимом. Мітотична активність була на низькому рівні ($p=0,003$ порівняно з контролем, для обох режимів ЛО, U-тест Манна-Уїтні).

Застосування концентрації хлорину Е6 2 мкг/мл із наступним ЛО з поступовим збільшенням потужності та дози призводило до ще більших деструктивних змін клітинного моношару. У культурах клітин лінії U251 після 24-годинної інкубації з хлорином Е6 (2 мкг/мл) та наступним ЛО (0,6 Вт, 10 Дж/см², безперервний режим)

спостерігали спустошення зони росту із залишковими скупченнями дегенеративно змінених клітин ($p=1\cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, U-тест Манна-Уїтні; **Рис. 8А**). Схожі наслідки за цих самих умов виявляли також у культурах клітин лінії НЕК293 (**Рис. 8В**). Імпульсний режим ЛО асоціювався з тенденцією до підсилення виявлених змін ($p=0,08$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні).

При збільшенні дози опромінення до 25 Дж/см² як у безперервному, так і в імпульсному режимі, спостерігали руйнацію зони росту із залишками клітин на різних стадіях дегенерації в культурах клітин обох досліджуваних ліній, але в культурах клітин лінії НЕК293 – значно меншої інтенсивності (**Рис. 8**). За таких умов зберігалася мітотична активність окремих клітин, особливо лінії НЕК293 ($p=0,04$ порівняно з контролем, $p=0,09$ порівняно з показником за безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні; **Рис. 9А, 9Б**).

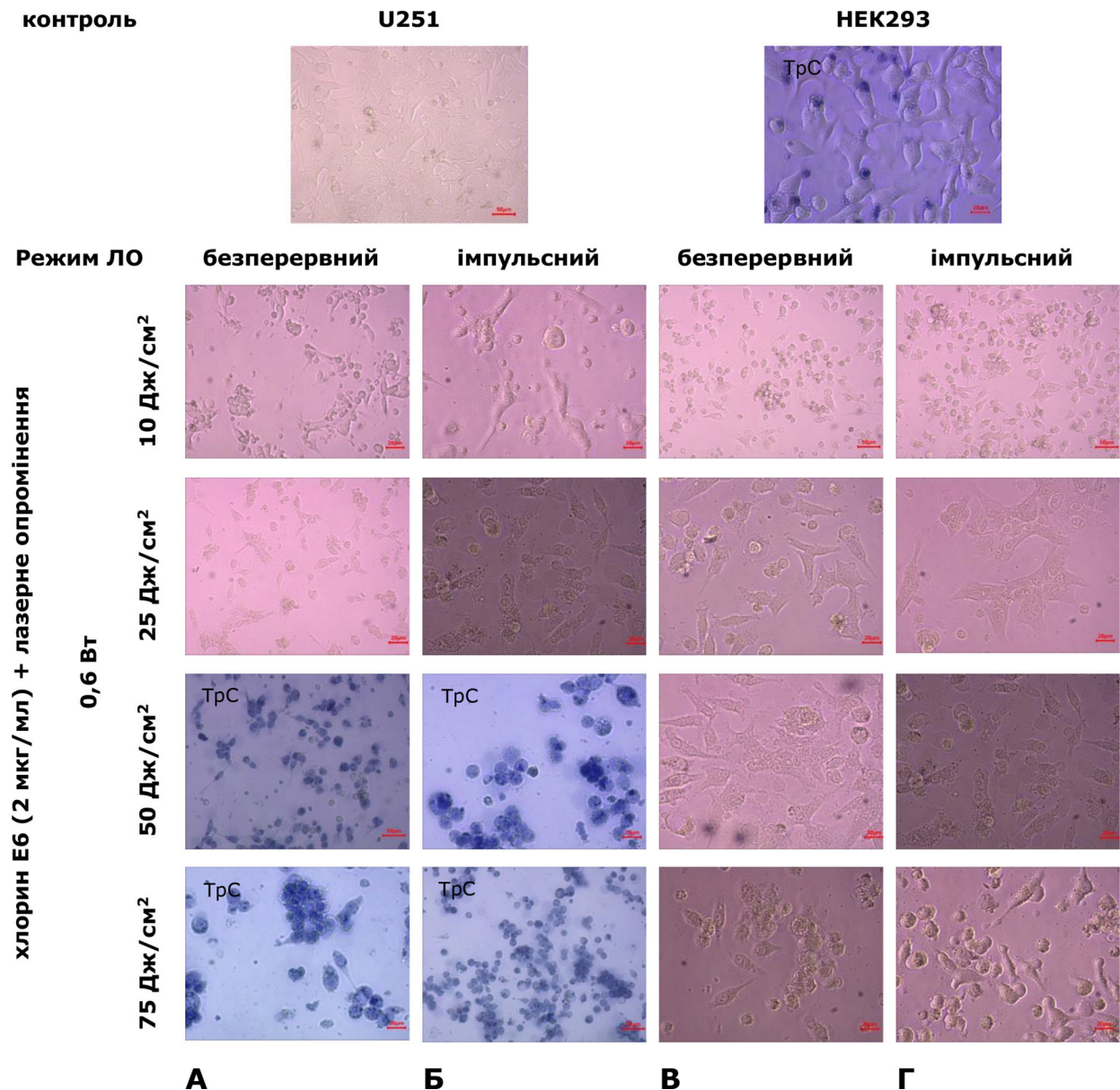


Рис. 8. Мікрофото культур клітин гліобластоми людини лінії U251 та клітин лінії НЕК293 за поєданого впливу хлорину Е6 (2 мкг/мл) і лазерного опромінення в різних режимах. Світлова мікроскопія. Незабарвлені культури та забарвлення вітальним барвником трипановим синім (ТрС)

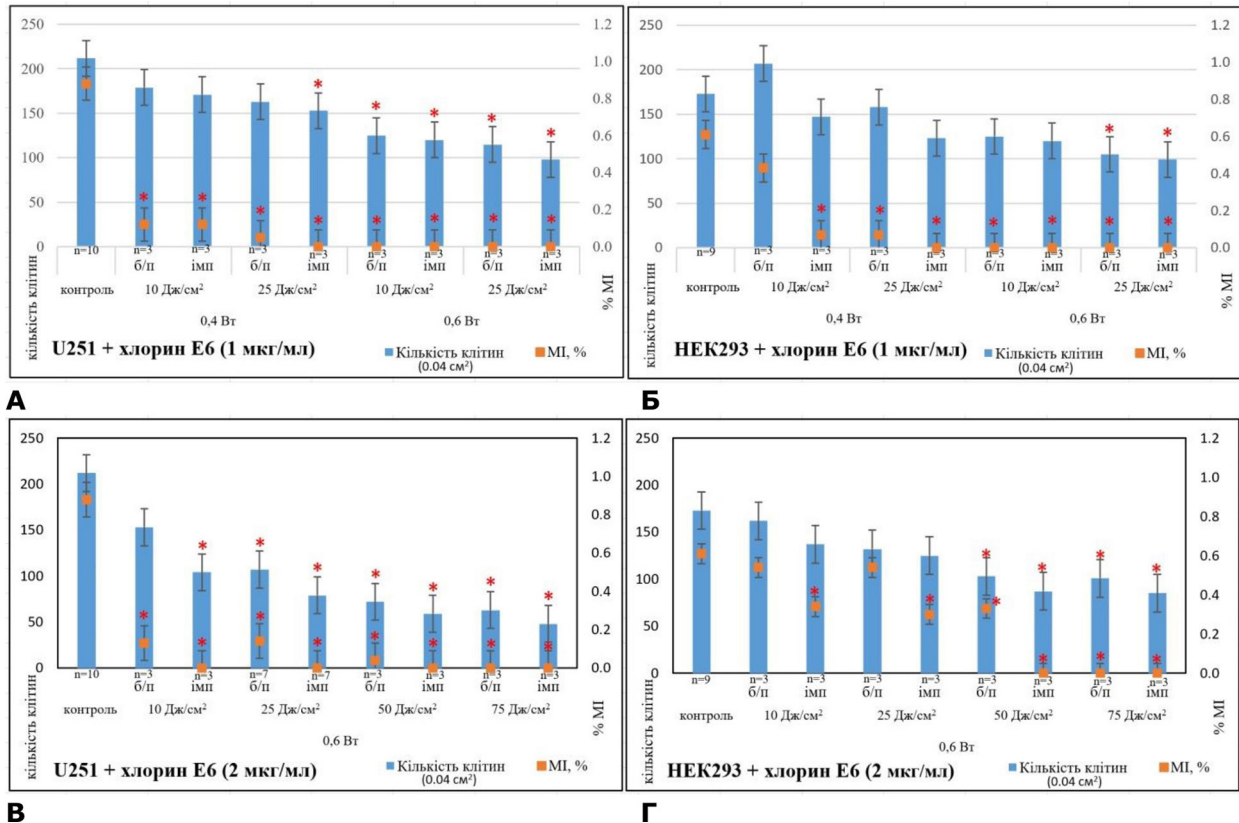


Рис. 9. Середня кількість клітин та мітотичний індекс (MI,%) у культурах клітин гліобластоми людини лінії U251(А,В) та клітин лінії HEK293 (Б,Г) через 24 год після поєднаного впливу хлорину Е6 (1 мкг/мл, 2 мкг/мл, попередня інкубація 4 год) та різних режимів лазерного опромінення: * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; U-тест Манна-Уїтні

Збільшення дози ЛО до 50 та 75 Дж/см² як у безперервному, так і в імпульсному режимі, дещо підсилювало ступінь руйнації зони росту клітин лінії U251. Окрім повністю зруйнованих ділянок зони росту, виявляли комплекси та шари адгезованих клітин, зокрема з відростками. Однак у більшості цих клітин відзначали дегенеративні зміни: втрату відростків, характерних морфологічних форм, вакуолізацію цитоплазми та накопичення в ній ліпідних гранул, порушення цілісності мембран (**Рис. 8А, 8Б**). Подібні зміни в зоні росту за таких самих умов експерименту відбувалися і в культурах клітин лінії HEK293 (**Рис. 8В, 8Г**).

Мітотичної активності клітин у культурах клітин лінії U251 практично не виявляли, починаючи з ЛО 25 Дж/см² (0,6 Вт, імпульсний режим ($p = 3 \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем, $p = 0,17$ порівняно з безперервним режимом ЛО, U-тест Манна-Уїтні) (**Рис. 9А**), тоді як у культурах клітин лінії HEK293 мітотичну активність клітин не реєстрували, починаючи з ЛО 50 Дж/см² (0,6 Вт, імпульсний режим) ($p = 0,04$ порівняно з контролем, $p = 0,29$ порівняно з безперервним режимом ЛО, U-тест Манна-Уїтні; **Рис. 9Б**).

Отже, проведені дослідження особливостей поєднаного впливу хлорину Е6 та ЛО на культури клітин ГБ людини лінії U251 свідчать про кумулятивний дозозалежний цитотоксичний ефект. Збільшення концентрації хлорину Е6 із 1 до 2 мкг/мл та нарощування потужності ЛО з 0,4 до 0,6 Вт і дози з 10 до 75 Дж/см² у безперервному режимі послідовно призводять

до руйнівних змін в архітектоніці зони росту (від ретракції зони росту з утворенням лакун різного розміру за найнижчих показників ЛО до грубої руйнації архітектоніки та значного спустошення клітинних масивів за найвищих показників) і динамічного зниження мітотичної активності пухлинних клітин ($p = (1-3) \cdot 10^{-6}$ порівняно з контролем), накопичення некробіотичних змін, незворотної дегенерації та десквамації загиблих клітин. Зазначений ефект має тенденцію до посилення при застосуванні ЛО в імпульсному режимі ($p = 0,37, p = 0,17, p = 0,45, p = 0,50$, відповідно для доз ЛО 10, 25, 50 і 75 Дж/см² порівняно з кількісними показниками культур за поєднаного впливу хлорину Е6 і безперервного режиму ЛО, U-тест Манна-Уїтні). Саме за поєднаного впливу хлорину Е6 (2 мкг/мл) та ЛО кількісні показники зниження мітотичної активності культури клітин ГБ людини лінії U251 дозозалежно набувають статистично значущих відмінностей порівняно з відповідними показниками за безпосереднього впливу ЛО, починаючи з дози 25 Дж/см² ($p = 0,05, p = 0,047, p = 0,013$ відповідно для доз ЛО 25, 50 і 75 Дж/см², U-тест Манна-Уїтні).

Характер змін у культурі клітин лінії HEK293 за поєднаного впливу хлорину Е6 та ЛО у тих самих режимах подібний до такого для клітин лінії U251, але на відміну від пухлинних клітин динаміка змін була не такою різкою, а їхній рівень – значно меншим. Суттєві патологічні зміни клітин лінії HEK293, щільності їх моношару та мітотичної активності виявляли, починаючи з режиму ЛО потужністю 0,6 Вт, доза

25 Дж/см², в імпульсному режимі при застосуванні 1 мкг/мл хлорину Е6 або ЛО потужністю 0,6 Вт, доза 50 Дж/см², в імпульсному режимі при використанні 2 мкг/мл хлорину Е6. Для клітин лінії U251 пороговими значеннями були такі характеристики ЛО: потужність 0,4 Вт, доза 25 Дж/см², імпульсний режим при застосуванні 1 мкг/мл хлорину Е6 або потужність 0,6 Вт, доза 10 Дж/см², імпульсний режим при використанні 2 мкг/мл хлорину Е6 (**Рис. 9**).

Результати дослідження поєднаного впливу хлорину Е6 (1 і 2 мкг/мл, попередня інкубація 4 год) та ЛО у різних режимах ($\lambda=660$ нм, потужність 0,4–0,6 Вт, доза 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) дають підставу для висновку про достатню ефективність цитодеструктивного й антимітотичного ефекту в культурі клітин ГБ людини лінії U251 за поєднаного застосування дози опромінення 25 Дж/см², потужністю 0,6 Вт в імпульсному режимі з хлорином Е6 у концентрації 2 мкг/мл (з попередньою інкубацією культури клітин упродовж 4 год). Використання поєднаного впливу ФС та ЛО із зазначеними характеристиками в культурі клітин лінії НЕК293, що мають подібний до нейронального фенотип, не спричинило таких значущих цитодеструктивних ефектів, як у культурі пухлинних клітин лінії U251, тобто клітини ГБ людини лінії U251 є чутливішими до фотодинамічного впливу хлорину Е6 та ЛО порівняно з клітинами лінії НЕК293. Одним із пояснень цього, імовірно, є дані про вищий рівень метаболізму пухлинних клітин ЗГ порівняно з нетрансформованими клітинами [31,32], а також про швидше накопичення ними ФС порівняно з нейроклітинами. Селективність накопичення ФС у пухлинних клітинах пов'язана з низькими значеннями рН унаслідок надмірної продукції молочної кислоти при активному гліколізі порівняно з нормальними клітинами. Вважають, що ФС краще розчиняється в кислому середовищі та, як наслідок, краще накопичується у пухлинних клітинах [33].

Антимітотичний ефект застосованих режимів фотодинамічного впливу при використанні хлорину Е6 у культурі клітин ГБ людини лінії U251 узгоджується з даними щодо зниження проліферації та клоногенної здатності клітин ГБ (T98G, MO59, LN229, U87-MG) у культурі після фотодинамічного впливу із застосуванням фталоціанінів ZnPc і TAZnPc [29].

Таким чином, за результатами морфологічного та морфометричного дослідження встановлено, що ФС хлорин Е6 інкорпорується в цитоплазму клітин лінії ГБ людини U251 та клітин лінії НЕК293, інтенсивність флуоресценції є порівнянною. За безпосереднього впливу хлорину Е6 (1,0 та 2,0 мкг/мл) упродовж 24 год дозозалежно підсилюються цитодеструктивні й антимітотичні ефекти в культурі ГБ людини лінії U251. На відміну від клітин лінії U251 цитодеструктивний ефект хлорину Е6 на культурі клітин лінії НЕК293 є менш виразним, але антимітотичний ефект є відносно порівнянним в обох типах культур клітин. За впливу ЛО ($\lambda=660$ нм, потужність 0,4–0,6 Вт, доза 10–75 Дж/см², безперервний чи імпульсний режим) дозозалежно збільшуються цитодеструктивні й антимітотичні ефекти в культурі клітин ГБ людини лінії U251. Рівень цитодеструктивних і антимітотичних ефектів суттєво менший у культурах непухлинних клітин лінії НЕК293. Найбільш значуще зменшення мітотичної активності клітин ГБ людини лінії U251 (~100%) зафіксовано при найменшій дозі ЛО 25 Дж/см², потужності 0,6 Вт, в

імпульсному режимі, тоді як для клітин лінії НЕК293 (~80%) – при ЛО потужністю 0,6 Вт, доза 75 Дж/см², у безперервному режимі. Поєднання впливу хлорину Е6 та ЛО у міру збільшення дози призводить до майже повної деструкції пухлинних клітин у культурі клітин ГБ людини лінії U251. Тотальний цитодеструктивний і антимітотичний ефект у культурі клітин ГБ людини лінії U251 досягається за поєднаного застосування найменшої дози опромінення 25 Дж/см², потужності 0,6 Вт, в імпульсному режимі та хлорину Е6 у концентрації 2 мкг/мл. На відміну від клітин ГБ людини лінії U251 зазначений режим фотодинамічного впливу не є незворотно руйнівним для культур клітин лінії НЕК293: на тлі зменшення загальної кількості клітин в 1,3 разу референтні клітини зберігають мітотичну активність (MI~0,3%).

Отже, клітини ГБ людини лінії U251 є чутливішими до кумулятивного ефекту фотодинамічного впливу хлорину Е6 та ЛО порівняно з клітинами лінії НЕК293. Ефективним режимом фотодинамічного впливу для досягнення достатнього цитодеструктивного й антимітотичного ефекту в культурі клітин ГБ людини лінії U251 є поєднане застосування дози опромінення 25 Дж/см², потужність 0,6 Вт, в імпульсному режимі при попередній інкубації культури клітин із хлорином Е6 у концентрації 2 мкг/мл упродовж 4 год. Цей режим є значно менш руйнівним, а отже, відносно безпечнішим для культур лінії НЕК293.

Висновки

У результаті проведеного морфологічного та морфометричного дослідження встановлено ефективний режим фотодинамічного впливу для досягнення цитодеструктивного й антимітотичного ефекту в культурі клітин ГБ людини лінії U251, що є відносно безпечним для немалігнізованих клітин: поєднане застосування дози ЛО 25 Дж/см², потужність 0,6 Вт, в імпульсному режимі при попередній інкубації культури клітин із хлорином Е6 у концентрації 2 мкг/мл упродовж 4 год.

Подяка

Автори висловлюють щирі подяку старш. наук. співроб. відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України канд. біол. наук Олександрі Лиховій за люб'язно надані зразки клітинних ліній U251 та НЕК293 для культивування та 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

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660
- Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary

- Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016-2020. *Neuro Oncol.* 2023 Oct 4;25(12 Suppl 2):iv1-iv99. doi: 10.1093/neuonc/noad149. PMID: 377931257
3. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G, Soffietti R, von Deimling A, Ellison DW. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
 4. 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
 5. Fedorenko Z, Goulak L, Gorokh Ye, Ryzhov A, Soumkina O. CANCER IN UKRAINE, 2021-2022: Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine.* 2023;24. http://ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF_E/bull_eng_24.pdf
 6. 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
 7. 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
 8. Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas. *J Clin Laser Med Surg.* 1996 Oct;14(5):263-70. doi: 10.1089/clm.1996.14.263
 9. Cramer SW, Chen CC. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. *Front Surg.* 2020 Jan 21;6:81. doi: 10.3389/fsurg.2019.00081
 10. Muragaki Y, Akimoto Y, Maruyama T, Iseki H, Ikuta S, Nitta M, Maebayashi K, Saito T, Okada Y, Kaneko S, Matsumura A, Kuroiwa T, Karasawa K, Nakazato Y, Kayama T. Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. *J Neurosurg.* 2013 Oct;119(4):845-52. doi: 10.3171/2013.7.JNS13415
 11. Quirk BJ, Brandal G, Donlon S, Vera JC, Mang TS, Foy AB, Lew SM, Girotti AW, Jugal S, LaViolette PS, Connolly JM, Whelan HT. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Sep;12(3):530-44. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.04.009
 12. Senders JT, Muskens IS, Schnoor R, Karhade AV, Cote DJ, Smith TR, Broekman ML. Agents for fluorescence-guided glioma surgery: a systematic review of preclinical and clinical results. *Acta Neurochir (Wien).* 2017 Jan;159(1):151-167. doi: 10.1007/s00701-016-3028-5
 13. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006 May;7(5):392-401. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70665-9
 14. Kostron H, Obwegeser A, Jakober R. Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. *J Photochem Photobiol B.* 1996 Nov;36(2):157-68. doi: 10.1016/s1011-1344(96)07364-2
 15. 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
 16. Schipmann S, Muther 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;134(2):426-436. doi: 10.3171/2019.11.JNS192443
 17. Vermandel M, Dupont C, Lecomte F, Leroy HA, Tuleasca C, Mordon S, Hadjipanayis CG, Reynolds 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
 18. Eljamel MS, Goodman C, Moseley H. ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. *Lasers Med Sci.* 2008 Oct;23(4):361-7. doi: 10.1007/s10103-007-0494-2
 19. van Linde ME, Brahm CG, de Witt Hamer PC, Reijneveld JC, Bruynzeel AME, Vandertop WP, van de Ven PM, Wagemakers M, van der Weide HL, Enting RH, Walenkamp AME, Verheul HMW. Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme: a retrospective multicenter analysis. *J Neurooncol.* 2017 Oct;135(1):183-192. doi: 10.1007/s11060-017-2564-z
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. Zavadskaia TS. Photodynamic therapy in the treatment of glioma. *Exp Oncol.* 2015 Dec;37(4):234-41.
 24. Гамалія МФ, Шишко ЄД, Штонь ІО, Холін ВВ, Щербаків ОБ, Усатенко ОВ. Фотодинамічна активність сенсibilізатора другого покоління фотолону (хлорину Е6) та його золотого наноконструктиву: дослідження in vitro та in vivo. *Фотобіологія та Фотомедицина.* 2012;9(1-2):99-103. <https://periodicals.karazin.ua/photomedicine/article/view/13195>
 25. U-251 MG (formerly known as U-373 MG) (ECACC 09063001). Culture Collections. UK Health Security Agency; 2024. https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=09063001&collection=ecacc_gc
 26. HEK293 (ECACC 85120602). Culture Collections. UK Health Security Agency; 2024. <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/293>
 27. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun.* 2014 Sep 3;5:4767. doi: 10.1038/ncomms5767
 28. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene.* 2015 Sep 15;569(2):182-90. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065
 29. Velazquez FN, Miretti M, Baumgartner MT, Caputto BL, Tempesti TC, Pucca 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
 30. Rozumenko VD, Liubich LD, Staino L.P., Egorova D.M., Vaslovych VV, Rozumenko AV, Komarova OS, Dashchakovskiy AV, Kluchka VM, Malysheva TA. Effects of photodynamic exposure using chlorine E6 on U251 glioblastoma cell line in vitro. *Ukrainian Neurosurgical Journal.* 2023; 29(2): 11-21. doi: 10.25305/unj.273699
 31. Márquez J, Alonso FJ, Matés JM, Segura JA, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA. Glutamine Addiction In Gliomas. *Neurochem Res.* 2017 Jun;42(6):1735-1746. doi: 10.1007/s11064-017-2212-1
 32. Rivera JF, Sridharan SV, Nolan JK, Miloro SA, Alam MA, Rickus JL, Janes DB. Real-time characterization of uptake kinetics of glioblastoma vs. astrocytes in 2D cell culture using microelectrode array. *Analyst.* 2018 Oct 8;143(20):4954-4966. doi: 10.1039/c8an01198b
 33. Moan J, Peng Q. An outline of the history of PDT. *Patrice T, editor. Photodynamic Therapy.* London: The Royal Society of Chemistry; 2003. p. 1-18. doi: 10.1039/9781847551658-00001