

DOI 10.36074/logos-01.10.2021.v1.19

## ВСТАНОВЛЕННЯ ПОРОГОВОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРА «ФОТОЛОН» ДЛЯ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ЛІНІЇ А-549

**Лавренчук Галина Йосипівна**

докт. біол. наук, професор, завідувач лабораторії клітинної радіобіології  
Інституту експериментальної радіології  
Державна установа  
*«Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»*

**Почапінський Олексій Дмитрович**

аспірант лабораторії клітинної радіобіології  
Інституту експериментальної радіології  
Державна установа  
*«Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»*

**А.В. Чернишов**

ст.н.співр. лабораторії клітинної радіобіології  
Інституту експериментальної радіології  
Державна установа  
*«Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»*

УКРАЇНА

Метод фотодинамічної терапії (ФДТ) є одним із ефективних малоінвазивних сучасних методів лікування диспластичних змін і злоякісних новоутворень, особливо на ранніх стадіях розвитку. Для успішного виконання ФДТ необхідні певні умови, а саме: оптимальна концентрація фотосенсибілізатора (ФС), опромінення світлом оптичного діапазону певної довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання фотосенсибілізатора і достатньою щільністю потужності випромінювання, яке поглинається пухлиною. Активна речовина фотосенсибілізатора «Фотолон» – хлорин E<sub>6</sub> – вибірково накопичується у патологічній тканині (доброякісні та злоякісні новоутворення різного ґенезу і локалізації) [1, 2] і при локальному впливу світла з довжиною хвиль 630-670 нм (червоне світло) забезпечує фотосенсибілізуючий ефект, який призводить до пошкодження пухлинної тканини. «Фотолон» також є високоінформативним діагностичним засобом при спектрофлуоресцентному дослідженні.

Метою дослідження було вивчення цитотоксичного впливу фотосенсибілізатора «Фотолон» на перещеплювану культуру клітин лінії недрібноклітинного раку легені людини – А-549, дослідження структурних та морфофункціональних змін.

Цитотоксичні властивості ФС, його здатність впливати на виникнення патологій, пов'язаних зі зміною структури й функціонування клітин, вивчали на клітинній лінії недрібноклітинного раку легені людини – А-549. Досліджувані клітини А-549 (отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України) культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640 («SIGMA»,

США), що містить 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти («SIGMA», США), 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> при 37°C у флаконах для культур клітин 50 мл (DELTALAB, Spain). Заміну середовища проводили кожні 3 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою 10% розчину трипсину при утворенні клітинами суцільного моношару (4–5 доба росту). Для дослідження чутливості клітин до фотосенсибілізатора суспензію клітин висаджували у флакони з покривним склом площею (8x16) мм в концентрації 5x10<sup>4</sup> клітин/мл в 2 мл повного поживного середовища. Через 24 год. вносили досліджувану сполуку у концентраціях: 0,25 мг/мл, 0,50 мг/мл, 1,25, мг/мл та 5 мг/мл та інкубували клітини за стандартних умов 24 год, після чого на 3, 4, та 5 доби готували препарати для оптичної мікроскопії: клітини фіксували у 70° етанолі, відмивали проточною холодною водою і забарвлювали гематоксиліном-еозином. Забарвлені препарати після просвітлення у ксилолі наклеювали на предметне скло канадським бальзамом.

Клітинні відповіді оцінювали у різні терміни культивування клітин за загальноприйнятими показниками життєздатності: проліферативна і мітотична активність та кількість атипичних клітин. Проліферативну активність клітин оцінювали за кінетикою росту. Під оптичним мікроскопом «Axioscop» (West Germany) при збільшенні у 1000 разів у межах сітки методом випадкових полів по С. Б. Стефанову підраховували загальну кількість клітин, кількість мітозів і кількість атипичних клітин. Мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів розраховувався на 1000 клітин (%). Статистичний аналіз вірогідності отриманих даних проводили за допомогою t-критерію Стьюдента, використовуючи неліцензовані комп'ютерні програми Microsoft Excel та Biostat з попередньою перевіркою гіпотези про нормальний закон розподілу випадкової величини за критерієм Колмогорова – Смірнова.

Дія фотосенсибілізатора «Фотолон» на клітини лінії А-549 в концентраціях, при яких не спостерігається цитотоксичний ефект, морфофункціональний стан суттєво не змінюється за всіма досліджуваними характеристиками. Тобто, при низькій (0,25 мкг/мл) концентрації ФС на клітини лінії А-549 не відбувається кластогенних порушень та змін клітинної проліферації.

Водночас, було встановлено, що при додаванні до культури клітин А-549 ФС «Фотолон» зміна структури моношару спостерігалась уже за концентрації 0,50 мкг/мл, а саме: щільність клітинної популяції була значно меншою, ніж в інтактних культурах; зменшувалась мітотична активність і наростала кількість атипичних клітин – двоядерних і клітин з мікроядрами, а також апоптотичних клітин на різних стадіях. Це може свідчити про генотоксичну дію фотосенсибілізатора. Морфологічні зміни клітин проявлялись у вигляді вакуолізованої цитоплазми, ацентрично розміщеними ядрами. Форма клітин, зазвичай епітеліоподібна, трансформувалась у полігональну з багатьма псевдоподіями і виростами. Збільшення концентрації ФС 1,25 та 5,00 мкг/мл призвело до деструктивних змін клітинного моношару: зменшення розмірів клітин, втрати цитоплазми, зменшення кількості мітозів, збільшення аномальних клітин (двоядерних та клітин з мікроядрами). Одночасно виявляли збільшення кількості клітин з різноманітними ядерними протрузіями – ядерними аномаліями, такими як каріорексис, хвостаті ядра, ядра атипової форми, гантелеподібні ядра тощо.

**Висновок.** Представлені результати експериментальних досліджень впливу фотосенсибілізатора «Фотолон» на перещеплювані злоякісні клітини людини лінії А-549 з метою встановлення порогової концентрації для

ефективності фотодинамічного впливу свідчать, що морфофункціональні характеристики культури злоякісних клітин змінюються в залежності від концентрації фотосенсибілізатора. Із збільшенням концентрації «Фотолон» зменшуються щільність клітинної популяції та мітотична активність. Водночас з'являються атипів клітини (двоядерні та з мікроядрами), апоптотичні клітини, що може вказувати на генотоксичну дію фотосенсибілізатора.

#### **Список використаних джерел:**

- [1] Таранец Т. А., Сухова Т. Е. & Романко Ю. С. (2007) ФДТ базально-клеточного рака кожи с локальным и внутривенным использованием фотосенсибилизатора хлоринового ряда «Фотолон». *Альманах клинической медицины*, (15), 283-288.
- [2] Южаков В. В., Бурмистрова Н. В. & Фомина Н. К., (2016) и др. Морфофункциональные характеристики саркомы м-1 крыс после фотодинамической терапии с производным бактериохлорофилла. *A. biomedical photonics*, (5(4)), 4-14. <https://doi.org/10.24931/2413-9432-2016-5-4-4-14>