

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ФОТОСЕНС, ФОТОДИТАЗИН И ГИПЕРИЦИН НА КЛЕТКИ ГЛИОМЫ И ПЕРВИЧНЫЕ НЕЙРОНАЛЬНЫЕ КУЛЬТУРЫ *in vitro*

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.06

УДК 542.61:611.018.82:616.8–006.494:615.831

Поступила 2.08.2019 г.



Т.А. Мищенко, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины²;

Е.В. Митрошина, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины²;

В.Д. Турубанова, магистр кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; лаборант кафедры общей медицинской генетики Института биологии и биомедицины¹;

Р. Альзеибак, аспирант кафедры биофизики Института биологии и биомедицины¹;

И.В. Балалаева, к.б.н., доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины¹;

М.В. Ведунова*, д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биологии и биомедицины¹; директор Института биологии и биомедицины¹;

D.V. Krysko*, MD, PhD, Leading Researcher, Department of General Medical Genetics, Institute of Biology and Biomedicine¹; Associate Professor, Head of Cell Death Investigation and Therapy Laboratory, Department of Human Structure and Repair, Faculty of Medicine and Health Sciences³; Group Leader at CRIG⁴

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1, Н. Новгород, 603005;

³Ghent University, Corneel Heymanslaan 10, Bldg 4B3, 9000, Ghent, Belgium;

⁴Cancer Research Institute Ghent (CRIG), Corneel Heymanslaan 10, Bldg 4B3, 9000, Ghent, Belgium

Цель исследования — сравнить эффекты воздействия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гиперацин на первичные культуры клеток головного мозга и оценить их токсическое действие на нормальные нервные клетки и клетки глиомы с целью выбора препарата с оптимальными для лечения глиом свойствами.

Материалы и методы. Оценка цитотоксичности препаратов фотосенс (ГНЦ «НИОПИК», Россия), фотодитазин («Вета-гранд», Россия), гиперацин (Merck KGaA; Sigma-Aldrich, Германия) выполнена на первичных культурах клеток гиппокампа эмбрионов мышей линии C57BL/6 (18-й день гестации). На 14-й день культивирования исследуемые фотосенсибилизаторы добавляли в среду культивирования в концентрациях 0,1; 1; 10; 50 и 100 мкМ. Культуры помещали в условия CO₂-инкубатора с защитой от прямых солнечных лучей. Жизнеспособность первичных культур оценивали через 3 и 7 сут после добавления тестируемых соединений. С применением метода конфокальной микроскопии проводили анализ скорости поступления и субклеточной локализации фотосенсибилизаторов в клетки первичных нейрональных культур. Статистический анализ выполняли в программе SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США) с помощью пакета ANOVA.

Результаты. Проанализированы спектры поглощения и флуоресценции исследуемых фотосенсибилизаторов. Фотосенс и фотодитазин показали наличие в спектре максимумов поглощения в коротковолновой и длинноволновой областях спектра. Для гиперацина характерен сложный спектр поглощения с множеством максимумов как в сине-фиолетовой, так и в оранжево-красной областях. Оценка жизнеспособности показала, что высокие концентрации фотосенсибилизаторов оказывают сильное токсическое действие на клетки нервной системы. Наиболее выраженное действие — у фотодитазина. Наименьшей скоростью накопления в клетках нервной системы обладает фотосенс. Установлено, что фотосенс и гиперацин, обладающие высоким фототоксическим действием на клетки глиомы, демонстрируют сравнительно низкую темную токсичность для нормальных клеток нервной системы.

Для контактов: Мищенко Татьяна Александровна, e-mail: saHarnova87@mail.ru

*М.В. Ведунова и D.V. Krysko делят главное соавторство.

Заключение. Наименее токсичными для нервной ткани, но эффективно проникающими в клетки опухоли являются фотосенсибилизаторы гиперичин и фотосенс. Эти свойства позволяют считать их перспективными фотодинамическими агентами для практического применения.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы; фотосенс; фотодитазин; гиперичин; фотодинамическая терапия; нейроонкология; цитотоксичность; первичные культуры нервных клеток.

Как цитировать: Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Turubanova V.D., Alzeibak R., Balalaeva I.V., Vedunova M.V., Krysko D.V. Effect of photosensitizers photosens, photodithazine and hypericin on glioma cells and primary neuronal cultures: a comparative analysis. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 52–63, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.06>

English

Effect of Photosensitizers Photosens, Photodithazine and Hypericin on Glioma Cells and Primary Neuronal Cultures: a Comparative Analysis

T.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine²;

E.V. Mitroshina, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹; Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine²;

V.D. Turubanova, Master Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹; Laboratory Assistant, Department of General Medical Genetics, Institute of Biology and Biomedicine¹;

R. Alzeibak, PhD Student, Biophysics Department, Institute of Biology and Biomedicine¹;

I.V. Balalaeva, PhD, Associate Professor, Biophysics Department, Institute of Biology and Biomedicine¹;

M.V. Vedunova, DSc, Leading Researcher, Institute of Biology and Biomedicine¹; Director of Institute of Biology and Biomedicine¹;

D.V. Krysko, MD, PhD, Leading Researcher, Department of General Medical Genetics, Institute of Biology and Biomedicine¹; Associate Professor, Head of Cell Death Investigation and Therapy Laboratory, Department of Human Structure and Repair, Faculty of Medicine and Health Sciences³; Group Leader at CRIG⁴

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

³Ghent University, Corneel Heymanslaan 10, Bldg 4B3, 9000, Ghent, Belgium;

⁴Cancer Research Institute Ghent (CRIG), Corneel Heymanslaan 10, Bldg 4B3, 9000, Ghent, Belgium

The aim of the study was to compare the effect of photosensitizers photosens, photodithazine, and hypericin on primary brain cell cultures, and assess their toxic effect on tumor and normal nervous cells in order to choose the optimal photodynamic agent for glioma therapy.

Materials and Methods. The cytotoxicity of photosens (NIOPIK, Russia), photodithazine (Veta-grand, Russia) and hypericin (Merck KGaA; Sigma-Aldrich, Germany) was assessed on primary brain cell cultures obtained from C57BL/6 mice (gestation day 18). On day 14 of cultivation, the tested photosensitizers were added to a culture medium at concentrations of 0.1; 1; 10; 50, and 100 μM . Then the cultures were placed in a CO_2 -incubator in the dark. The viability of primary neuronal cultures was estimated on days 3 and 7 after photosensitizer application. Using confocal microscopy, we analyzed the rate of entry and subcellular localization of the tested agents in the primary neuronal cells. Statistical analysis was performed in SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., USA) using ANOVA.

Results. We analyzed the absorption and fluorescence spectra of the tested photosensitizers. Photosens and photodithazine showed the presence of absorption maximum in short- and long-wave spectral ranges. Hypericin was characterized by a complex spectrum with many peaks in both blue-violet and orange-red spectral ranges. Cell viability analysis revealed that high concentrations of photosensitizers caused a pronounced toxic effect on nervous cells. The most marked effect was shown for photodithazine. Photosens exhibited the lowest accumulation rate in primary neuronal cells. Photosens and hypericin were found to have a high phototoxic effect on glioma, and demonstrated low dark toxicity for normal brain cells.

Conclusion. The photosensitizers hypericin and photosens are the least toxic for nervous tissue, though effectively penetrating in tumor cells. These properties enable to consider them as prospective photodynamic agents for clinic.

Key words: photosensitizers; photosens; photodithazine; hypericin; photodynamic therapy; neurooncology; cytotoxicity; primary neuronal cultures.

Введение

Согласно данным центрального реестра Соединенных Штатов Америки (Central Brain Tumor Registry of the United States — CBTRUS), встречаемость случаев злокачественных и доброкачественных опухолей головного мозга в последние годы составляет 10,71 на 100 000 населения в возрасте до 39 лет, 40,10 — на 100 000 населения старше 40 лет [1, 2]. Глиомы — наиболее часто встречающийся тип опухолей головного мозга (75–80% первичных злокачественных новообразований), которые характеризуются выраженной гистологической гетерогенностью. К ним относятся астроцитомы (астроцитомы, анапластическая астроцитомы, мультиформная глиобластома), олигодендроглиомы и смешанные глиомы. Их отличительной особенностью является быстрый инвазивный рост, высокая скорость пролиферации и ангиогенеза, что значительно снижает эффективность терапии [3].

К настоящему времени лечение опухолей головного мозга представляет собой комплекс процедур, включающий микрохирургическое удаление опухоли с проведением в постоперационном периоде дистанционной лучевой и химиотерапии [4]. В большинстве случаев выполнение радикального хирургического извлечения опухоли не всегда возможно по причине выраженной ее способности к инфильтративному росту и вовлечению в злокачественный процесс функционально важных частей мозга. Кроме того, даже в случае максимальной резекции опухоли в перифокальной области у 96% пациентов возникают рецидивы опухолевого роста за короткий промежуток времени [5, 6].

Значительную сложность для терапии опухолей головного мозга представляет наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Несмотря на то что рост опухоли сопровождается повреждением ГЭБ и повышением его проницаемости, использование лекарственных препаратов и их поступление в очаг опухоли затруднено [7]. Проведенный скрининг известных к настоящему времени цитостатических препаратов установил их низкую эффективность при терапии опухолей мозга, в результате чего спектр препаратов, официально разрешенных для лечения злокачественных глиом, очень ограничен [8, 9].

Таким образом, прогноз для пациентов со злокачественной глиомой остается крайне неутешительным даже в случае использования современных методов лечения. Время жизни после операционного удаления опухоли в популяции составляет примерно 10 мес [10]. Низкая эффективность традиционной терапии опухолей головного мозга и неутешительные прогнозы для пациентов диктуют необходимость усовершенствования применяемых методик, а также поиска альтернативных подходов к лечению данной патологии.

В качестве эффективной адъювантной терапии глиом наибольший интерес представляет фотодинамическая терапия (ФДТ) [11]. Данный метод предполагает использование фотосенсибилизирующих агентов, ко-

торые способны проходить ГЭБ и селективно накапливаться в опухолевой ткани [9, 12]. При воздействии видимого светового облучения активированный фотосенсибилизатор приводит к генерации синглетного кислорода и радикальных активных форм кислорода, оказывающих прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки, что вызывает клеточную гибель, в том числе и по иммуногенному пути [13]. При проведении ФДТ также происходит повреждение микрососудистого окружения опухоли вследствие сосудистого застоя, тромбоза и кровоизлияния, приводящих к гипоксии клетки и последующей смерти [14, 15]. Эффективность фотодинамического повреждения клетки обусловлена внутриклеточной концентрацией сенсбилизатора, его локализацией в клетке, фотохимической активностью и дозой лазерного облучения.

В настоящее время в фотодинамической терапии опухолей головного мозга в качестве фотосенсибилизаторов активно используются производные гематопорфирина (HrD), хлорина, фталоцианина, а также 5-аминолевулиновая кислота, предшественник эндогенного протопорфирина IX [16]. В странах Европейского союза активно применяется гиперидин (Merck KGaA; Sigma-Aldrich, Германия) [17], который, как было показано в работе [18], индуцирует иммуногенную клеточную смерть в опухолевых клетках. В России для этих целей используются также синтетический сульфопталоцианин алюминия — фотосенс (ГНЦ «НИОПИК») [19] и препарат на основе хлорина природного происхождения — фотодитазин («Ветагранд») [20].

Однако поскольку применяемые фотодинамические агенты могут поступать не только в опухоль, но и в неповрежденную нервную ткань, принципиальным остается вопрос: являются ли концентрации соединений, эффективные при фотодинамической терапии, токсичными для нативных (не опухолевых) клеток нервной системы. Изучение темновой токсичности фотодинамических агентов позволит оценить возможные побочные эффекты, оказываемые ими на нейронные сети мозга, и подобрать наиболее безопасные соединения.

Цель исследования — сравнить эффекты воздействия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гиперидин на первичные культуры клеток головного мозга и оценить их токсическое действие на нормальные нервные клетки и клетки глиомы с целью выбора препаратов, обладающих оптимальными для использования в терапии глиом свойствами.

Материалы и методы

Используемые фотодинамические агенты. Проанализированы фотосенсибилизаторы, широко применяемые в настоящее время в клинической практике (рис. 1):

фотосенс — смесь ди-, три- и тетразамещенных фракций фталоцианина алюминия с числом сульфогрупп 3,4;

фотодитазин — бис-N-метилглюкаминная соль хлорина е6;

гиперицин (4,5,7,4',5',7'-гексагидрокси-2,2'-диметилнафтодиантрон).

Культивирование первичных культур клеток головного мозга. Материалом для исследований служили первичные культуры клеток больших полушарий головного мозга, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6 (18-й день гестации). Работа с животными выполнялась в соответствии с «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010), «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение биоэтической комиссии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Посадку и длительное культивирование диссоциированных клеток головного мозга осуществляли на стеклах (18×18 мм) согласно ранее разработанному протоколу [21]. Самки умерщвлялись путем дислокации шейных позвонков. Затем в стерильных условиях эмбрионы удаляли из матки, путем хирургических манипуляций проводили извлечение ткани головного мозга с последующей механической и 20-минутной ферментативной обработкой 0,25% раствором трипсина (Life Technologies, США). Исходная плотность клеток составляла 4500 кл./см². Жизнеспособность клеток поддерживали в условиях CO₂-инкубатора Shellab (Sheldon Manufacturing, США). В процессе культивирования диссоциированные нервные клетки образовывали между собой нейрон-глиальные сети с характерной пространственной топологией и функциональной активностью. Основные этапы формирования нейрон-глиальных сетей оценивали с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа DMIL HC (Leica Biosystems, Германия).

Определение темновой токсичности фотосенсибилизаторов. Для определения темновой токсичности исследуемых фотосенсибилизаторов в отношении нормальных клеток головного мозга на 14-й день развития первичных нейрональных культур *in vitro* осуществляли их добавление в среду культивирования в следующих концентрациях 0,1; 1; 10; 50 и 100 мкМ. Культуры помещались в условия CO₂-инкубатора и были защищены от прямых солнечных лучей.

Жизнеспособность первичных культур оценивали через 3 и 7 сут после добавления тестируемых соединений [21] с использованием инвертированного флюоресцентного микроскопа DMIL HC (Leica Biosystems, Германия) и специфических флюоресцентных красителей — пропидия иодида (Sigma-Aldrich, США) и бис-бензимида (Sigma-Aldrich) — с целью визуализации ядер погибших клеток и общего количества клеток в культуре.

Анализ скорости поглощения фотосенсибилизаторов нормальными клетками головного мозга. Особенности скорости поступления фотодинамических агентов в клетки первичных нейрональных культур оценивали с применением метода конфокальной микроскопии и системы LSM-510 NLO (Carl Zeiss, Германия). Для визуализации цитоплазмы метаболически активных клеток применяли флюоресцентный кальций-чувствительный краситель Oregon Green 488 BAPTA-1 AM — OGB1 (Thermo Fisher Scientific, США).

Флюоресценцию OGB1 возбуждали излучением аргонового лазера с λ=488 нм, регистрировали с помощью светофильтра с полосой пропускания 500–530 нм. Флюоресценцию тестируемых фотосенсибилизаторов возбуждали излучением He-Ne-лазера с λ=633 нм, регистрировали с помощью светофильтра с полосой 650–715 нм. Концентрация исследуемых фотосенсибилизаторов составляла 10 мкМ. Особенности накопления препаратов в клетках нервной системы оценивали через 2 и 4 ч инкубации.

Анализ субклеточной локализации фотосенсибилизаторов в клетках первичных нейрональных культур. Для установления субклеточной локализации фотосенсибилизаторов был проведен колокализационный анализ с флюоресцентными красителями, специфически маркирующими различные клеточные органеллы. Использованные красители

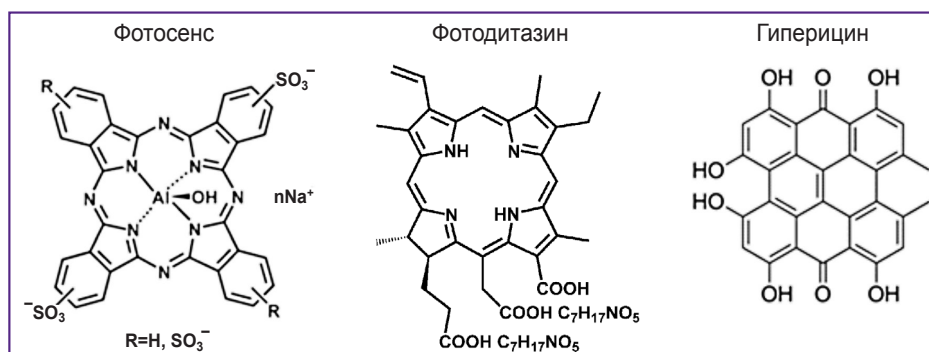


Рис. 1. Структурные формулы анализируемых фотосенсибилизаторов

(Life Technologies, США) имели следующие параметры регистрации их флюоресценции:

LysoTracker Green DND-26 — маркер лизосом; длина волны возбуждения — 488 нм; диапазон регистрации сигнала — 500–560 нм; максимум флюоресценции — 511 нм;

MitoTracker Green FM — маркер митохондрий; длина волны возбуждения — 488 нм; диапазон регистрации сигнала — 500–560 нм; максимум флюоресценции — 516 нм;

ER-Tracker Green — маркер эндоплазматического ретикулаума (ЭПР); длина волны возбуждения — 488 нм; диапазон регистрации сигнала — 500–560 нм; максимум флюоресценции — 511 нм.

На 14-й день развития культур *in vitro* производили замену культуральной среды на бессывороточную, содержащую исследуемый фотосенсибилизатор в концентрации 10 мкМ, и инкубировали в течение 4 ч. За 30 мин до окончания инкубации к клеткам добавляли краситель, окрашивающий лизосомы, митохондрии или ЭПР в концентрации 0,5 мкМ. По окончании инкубации среду с фотосенсибилизатором и красителем органелл заменяли на свежую бессывороточную.

На полученных изображениях колокализация используемого фотосенсибилизатора и красителя, специфично окрашивающего ту или иную органеллу, подтверждалась путем сравнения профилей распределения сигнала в соответствующих флюоресцентных каналах.

Статистический анализ данных. Полученные данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистическую значимость различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета ANOVA в программе SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Основные характеристики исследуемых фотосенсибилизаторов. На первом этапе были проанализированы спектры поглощения и флюоресценции используемых фотодинамических агентов (табл. 1). Тетрапиррольные соединения — фотосенс и фотодитазин — показали наличие в спектре максимумов поглощения в коротковолновой (полоса Sore) и длинноволновой (Q-полоса) областях спектра. Фотодитазин, относящийся к производным хлорина, характеризуется преобладанием коротковолновой полосы Sore, что типично для этой группы красителей. Сложный спектр поглощения с множеством максимумов как в сине-фиолетовой, так и в оранжево-красной области показан для гиперидина.

Анализ темновой токсичности фотосенсибилизаторов для нормальных клеток нервной системы. На следующем этапе работ была проведена

Т а б л и ц а 1

Спектральные свойства исследуемых фотосенсибилизаторов

Фотосенсибилизатор	λ_{abs} , нм	ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	λ_{em} , нм
Фотосенс	678*	$30 \cdot 10^{-4}$	690*
Фотодитазин	404* 643*	$30 \cdot 10^{-4}$ $4,6 \cdot 10^{-4}$	652*
Гиперидин	600**	$30 \cdot 10^{-4}$	604**

Примечание: в качестве растворителей использованы: * — вода; ** — DMSO (диметилсульфоксид). Здесь: λ_{abs} — максимум поглощения; λ_{em} — максимум флюоресценции.

оценка темновой токсичности исследуемых фотосенсибилизаторов для первичных культур клеток головного мозга. Следует отметить, что для клеток нервной системы недостаточно оценить краткосрочные токсические эффекты, поскольку в условиях стресса существуют определенные закономерности длительной деградации нейронных сетей. Поэтому были выбраны два принципиальных срока отсроченной оценки цитотоксичности. Это 3-и сутки после добавления фотосенсибилизатора в первичную культуру, так как в этот период гибнет большая часть клеток, подверженных токсическому действию, и 7-е сутки после воздействия, когда заканчиваются процессы гибели клеток, потерявших большое количество связей и получивших внутренний сигнал на программируемую гибель [22]. Кроме того, необходимо было оценить общую токсичность соединений для выявления сроков их эффективного воздействия на нервную систему.

Установлено, что высокие концентрации исследуемых коммерческих фотосенсибилизаторов оказывают выраженное токсическое действие на клетки нервной системы (рис. 2). На 7-е сутки после добавления исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ процент погибших клеток превышал 40% (после фотосенса — $44,98 \pm 4,93\%$; гиперидина — $63,80 \pm 4,12\%$; фотодитазина — $45,62 \pm 5,67\%$).

Более низкие концентрации фотосенса — 0,1; 1; 10 мкМ — не оказывали выраженного токсического действия: количество мертвых клеток в культурах с добавлением данного фотосенсибилизатора составляло $8,04 \pm 0,72$; $13,50 \pm 1,27$ и $8,56 \pm 0,75\%$ соответственно. Следует отметить, что количество мертвых клеток в группах 0,1 и 10 мкМ не отличалось от значений интактной группы ($7,20 \pm 1,28\%$).

В случае применения 10 мкМ гиперидина выявлен низкий токсический эффект, количество нежизнеспособных клеток превышало значения интактной группы и составило $15,76 \pm 1,40\%$. Более низкие концентрации гиперидина не проявляли выраженного токсического действия на первичные культуры клеток. Количество мертвых клеток на 7-е сутки после добавления составило $9,50 \pm 1,23\%$ (0,1 мкМ) и $13,21 \pm 1,36\%$ (1 мкМ).

Среди выбранных коммерческих фотосенси-

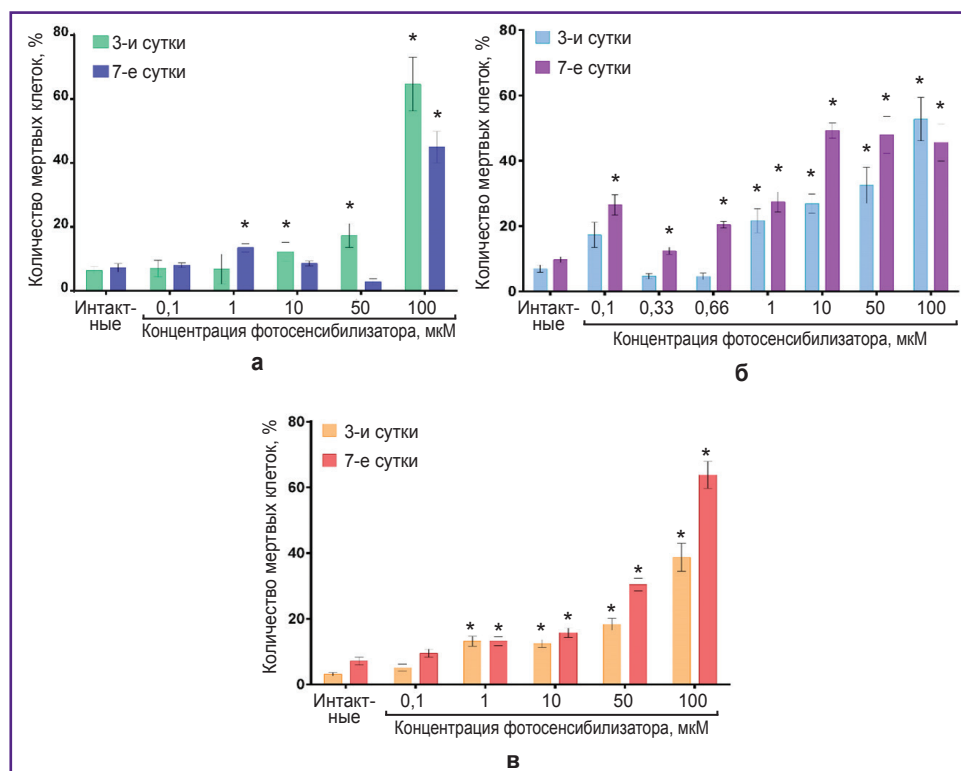


Рис. 2. Оценка темновой токсичности коммерческих фотосенсибилизаторов для первичных культур клеток головного мозга через 3 и 7 сут после добавления тестируемых соединений:

а — фотосенс; **б** — фотодитазин; **в** — гиперипин; ось Y — процент пропидий иодид позитивных (мертвых) клеток относительно их общего числа; * — значения статистически значимы относительно группы «Интактные», ANOVA, $p < 0,05$

билизаторов наиболее выраженным токсичным действием обладает фотодитазин. Даже при использовании низких концентраций данного соединения наблюдалось дозозависимое повышение процента мертвых клеток в культурах к 7-м суткам после его добавления. Количество нежизнеспособных клеток при применении 1 и 10 мкМ составило $30,08 \pm 4,40$ и $48,11 \pm 4,13\%$ соответственно. В связи с установленной высокой токсичностью фотодитазина были проанализированы дополнительные концентрации этого фотосенсибилизатора. Выявлено, что применение 0,66 мкМ препарата показывает среднюю степень токсичности для первичных культур, процент мертвых клеток в данной экспериментальной группе составил $19,63 \pm 1,62\%$.

Анализ скорости поступления исследуемых фотодинамических агентов в клетки первичных культур головного мозга. В отличие от других тканей организма клетки нервной системы имеют свои особенности метаболизма. Нейроглия специализируется на выполнении вспомогательных (в отношении нейронов) функций, в том числе трофической, секреторной и регуляторной, в то время как нейроны характеризуются сниженной способностью к поглощению различных соединений. Поскольку опухолевые клетки имеют более высокий уровень метаболизма и зача-

стую глиальную природу, эта особенность нейронов дает возможность подобрать соединения, быстрее накапливающиеся в злокачественно-трансформированных клетках, что позволит минимизировать повреждающее действие на нейроны при фотодинамическом воздействии.

С применением метода конфокальной микроскопии был проведен анализ скорости поступления исследуемых фотодинамических агентов в клетки первичных нейрональных культур. Установлено, что фотосенсибилизаторы гиперипин и фотодитазин активно накапливаются как в телах и отростках нейронов, так и в глиальных клетках уже через 2 ч после начала инкубации (рис. 3). На 4-часовой отметке данные соединения продолжали визуализироваться во всех типах клеток первичных нейрональных культур (рис. 4).

В отличие от этих фотодинамических агентов скорость поглощения фотосенса нейронами была снижена. На 2-часовой отметке накопление фотосенса наблюдалось только в глиальных элементах нейрон-глиальной сети. Присутствие фотосенсибилизатора в телах и отростках нейронов было обнаружено только по истечении 4-часовой инкубации.

Таким образом, среди тестируемых соединений фотосенсибилизатор фотосенс показал наименьшую скорость накопления в клетках нервной системы.

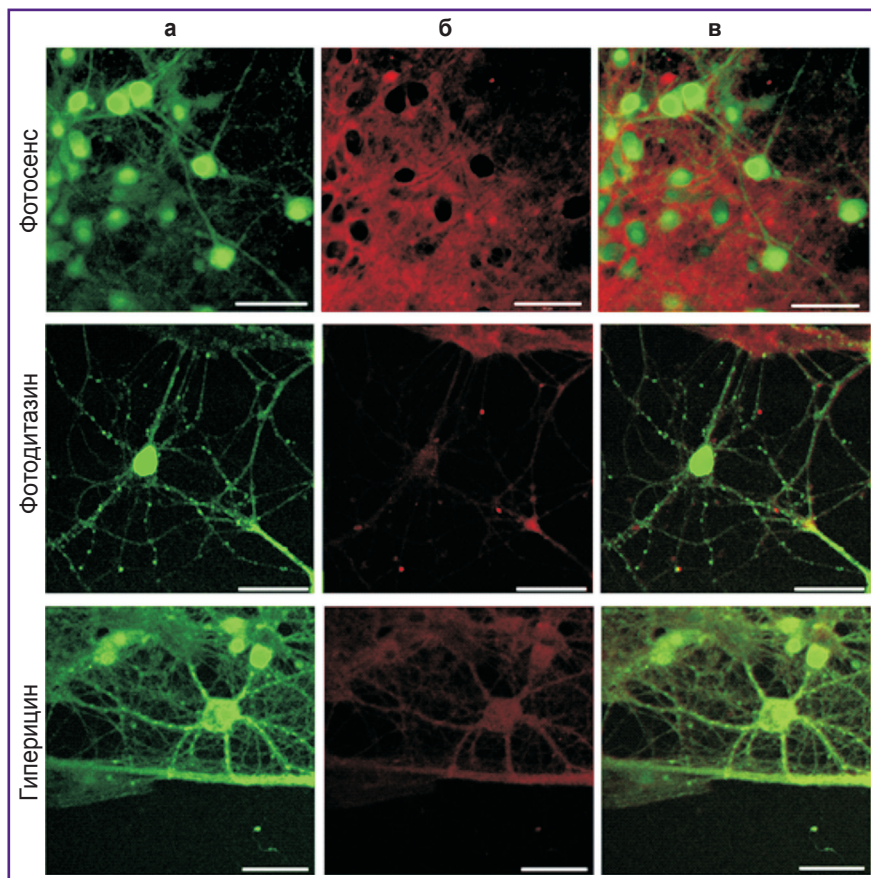


Рис. 3. Характерные конфокальные изображения первичных культур клеток головного мозга через 2 ч после начала инкубации с коммерческими фотосенсибилизаторами: а — канал флюоресценции кальций-чувствительного красителя Oregon Green 488 BAPTA-1 AM; б — канал флюоресценции фотосенсибилизатора; в — совмещение каналов флюоресценции; бар — 50 мкм

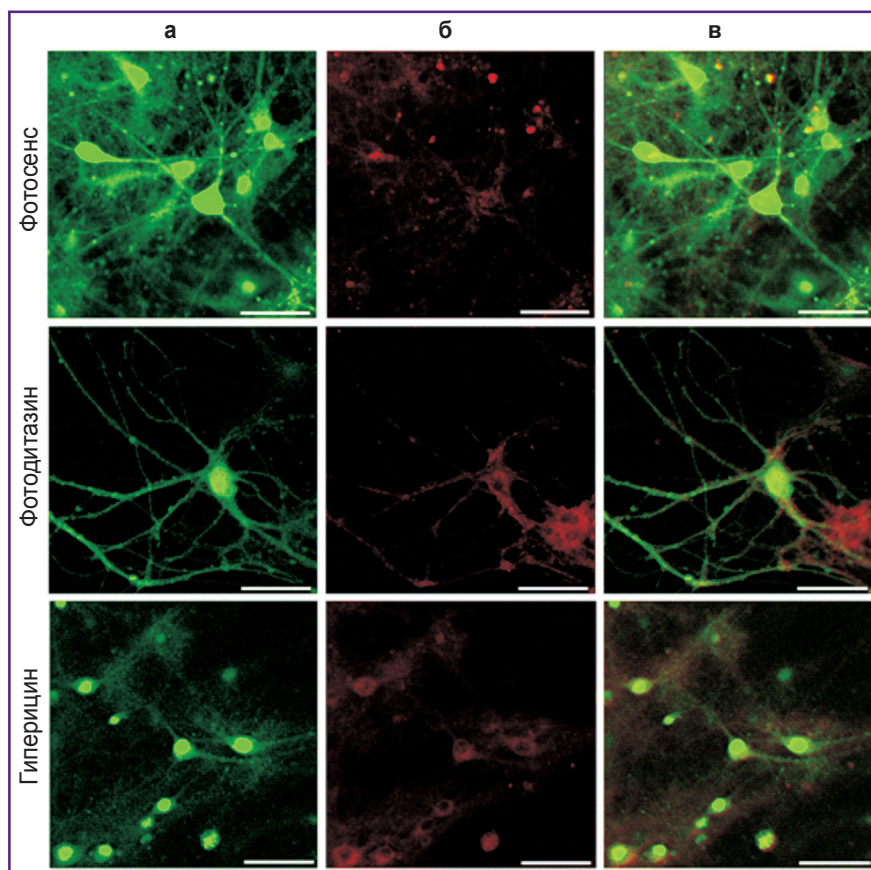
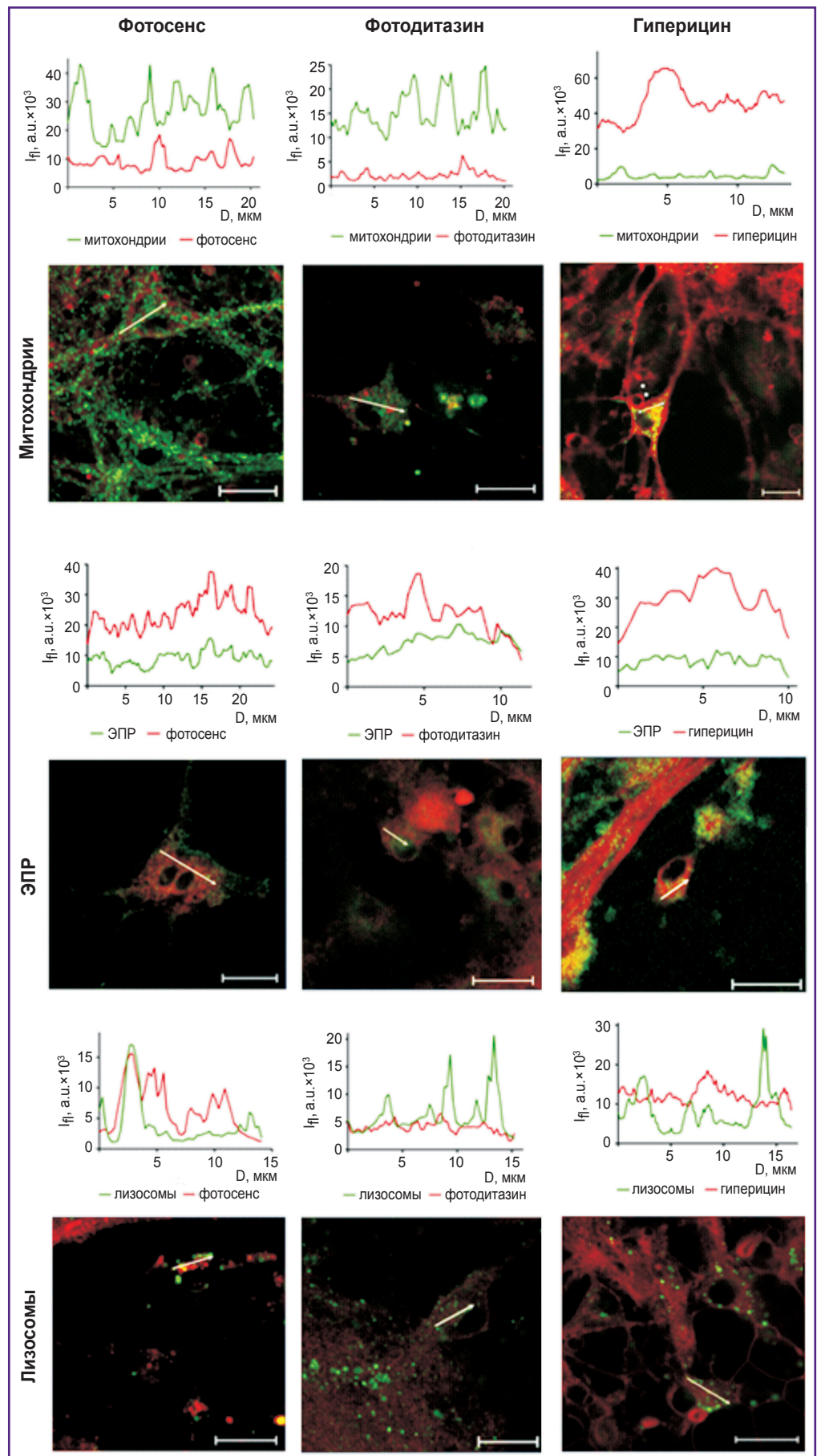


Рис. 4. Характерные конфокальные изображения первичных культур клеток головного мозга через 4 ч после начала инкубации с коммерческими фотосенсибилизаторами: а — канал флюоресценции кальций-чувствительного красителя Oregon Green 488 BAPTA-1 AM; б — канал флюоресценции фотосенсибилизатора; в — совмещение каналов флюоресценции; бар — 50 мкм

Рис. 5. Особенности внутриклеточной локализации исследуемых коммерческих фотосенсибилизаторов в первичных культурах клеток головного мозга

Время инкубации с фотодинамическим агентом — 2 ч, концентрация — 10 мкМ. Используются следующие красители органелл: LysoTracker Green DND-26 — для окраски лизосом; MitoTracker Green FM — для окраски митохондрий; ER-Tracker Green — для окраски эндоплазматического ретикула (ЭПР). Бар — 50 мкм. Справа показаны профили флуоресцентного сигнала вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях с наложением каналов флуоресценции. I_{fl} — интенсивность флуоресценции, усл. ед.; D — дистанция вдоль указанного отрезка



Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов в первичных культурах клеток головного мозга. Помимо скорости интернализации не менее важным аспектом изучения является внутриклеточная локализация фотодинамических агентов. На основании полученных в ходе исследования результатов можно определить первичные мишени при облучении, молекулярные механизмы ответа и иммуногенный характер гибели клетки [23, 24].

В связи с этим нами проанализирована серия конфокальных изображений первичных культур клеток головного мозга, полученных через 2 ч после инкубации с исследуемыми соединениями. Также изучена локализация сигнала флюоресценции фотосенсибилизатора с сигналом красителей, специфически окрашивающих такие клеточные органеллы, как лизосомы, ЭПР, митохондрии (рис. 5).

Установлено, что основным местом локализации фотосенса является ЭПР, а также частично лизосомы. Для остальных двух исследуемых фотосенсибилизаторов была характерна локализация только в ЭПР.

Сравнительный анализ гибели клеток глиомы и первичных нейрональных культур при воздействии фотодинамических агентов. Для более оптимального выбора фотодинамических агентов и подбора их концентраций, обладающих минимальной темновой токсичностью для нормальных клеток головного мозга и при этом имеющих выраженный терапевтический эффект при фотодинамическом воздействии, был проведен сравнительный анализ влияния фотосенсибилизаторов в установленных ранее концентрациях IC₅₀ в отношении клеток постоянной клеточной линии глиомы мыши GL261 (при облучении в дозе 20 Дж/см²) на первичные культуры клеток головного мозга, не подвергающиеся фотодинамическому воздействию. Облучение клеток глиомы GL261 проводили с использованием светодиодных матриц с центральной длиной волны излучения 630 нм при плотности мощности 20 мВт/см² в течение 16 мин 40 с. Для анализа использовалась шкала цитотоксичности по ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 (табл. 2).

Подобного рода исследования позволяют выявить соединения, которые потенциально могут обладать высоким фототоксическим действием на клетки глиомы, но быть малотоксичными для клеток нервной

Таблица 2

Шкала цитотоксичности по ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009

Цитотоксичность, баллы	Количество мертвых клеток в культуре, %	Интерпретация
0	0–10	Нецитотоксичный
1	10–20	Легкая цитотоксичность
2	20–30	Средняя цитотоксичность
3	Более 30	Значительная цитотоксичность

Таблица 3

Сравнительная оценка токсичности исследуемых фотосенсибилизаторов для клеток глиомы GL261 и первичных культур клеток головного мозга

Соединения	Концентрация IC ₅₀ (световая токсичность) для глиомы GL261, мкМ	Темновая токсичность для первичных культур клеток головного мозга в районе значений IC ₅₀ глиомы
Фотодитазин	0,8 [0,67; 0,92]	3 — значительная цитотоксичность
Фотосенс	0,96 [0,79; 1,18]	0 — нецитотоксичный
Гиперицин	0,015 [0,013; 0,017]	0 — нецитотоксичный

системы, даже в условиях долговременного циркулирования в спинно-мозговых жидкостях и межклеточном пространстве. На основании полученных нами результатов в данную группу однозначно можно отнести гиперацин и фотосенс (табл. 3).

Обсуждение

Терапия глиом остается нерешенной проблемой для мирового здравоохранения. Стремительное течение заболевания, высокая степень злокачественности и минимальные сроки дожития относят данную патологию в разряд крайне сложных для лечения и достижения качественной стойкой ремиссии. Ряд морфологических особенностей глиомы обуславливает риски образования метастазов, в первую очередь активную миграцию опухолевых клеток в непораженные участки мозга [3, 25, 26].

В случае использования адьювантной фотодинамической терапии при применении любых фармакологических агентов, в том числе фотосенсибилизаторов, необходимо учитывать, какое действие они оказывают на здоровые клетки. Нейроны головного мозга обладают некоторыми особенностями метаболизма, которые делают их крайне чувствительными к токсической нагрузке. Дифференцированные нейроны имеют ограниченный набор антиоксидантных ферментов, не способны к делению или регенерации, поэтому потеря большей части функционально активных связей приводит к их гибели [27, 28].

В нашем исследовании мы провели анализ токсического действия ряда коммерческих фотосенсибилизаторов на нормальные клетки головного мозга. Оценка темновой токсичности выбранных соединений свидетельствует о том, что фотодитазин обладает выраженным токсическим эффектом даже в условиях отсутствия фотоиндуцируемой клеточной гибели.

Большой интерес представляют данные о времени накопления фотосенсибилизаторов в клетках головного мозга и распределении фотоагента между нейронами и астроцитами. Расчет времени фотоиндукции с разработкой мер активной детоксикации

может стать возможным ключом для новой терапевтической стратегии на основе фотодинамических агентов. Клетки глиомы имеют более высокий уровень метаболизма по сравнению с нетрансформированными клетками [29, 30] и могут накапливать фотоагенты быстрее, чем клетки нервной системы. Поэтому логично предположить, что минимальными побочными эффектами для нормальных клеток будет обладать фотодинамический агент, скорость интернализации которого в нейронах — наименьшая, при этом она достаточно высока для опухолевых клеток. Среди исследуемых соединений таким является фотосенс.

Также нами были изучены особенности локализации фотосенсибилизаторов в клетках первичных культур головного мозга. Выявленной особенностью фотосенса является его локализация не только в ЭПР, но и частично в лизосомах. При этом в опухолевых клетках для фотосенса характерна везикулярная локализация. Фотосенс, являясь слабым основанием благодаря атомам азота тетрапиррольного кольца, легко проникает через лизосомальную мембрану и после диссоциации в условиях низкого pH остается в этих органеллах [31]. Следует предположить, что перераспределение фотосенса между органеллами снизит вероятность гибели нормальных клеток при фотодинамическом воздействии [31–33].

В последние годы ведутся интенсивные разработки и исследования молекулярных механизмов действия соединений, способных не только оказывать цитотоксический эффект, но и активировать противоопухолевый иммунный ответ. При гибели опухолевых клеток по иммуногенному пути происходит секреция так называемых молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMPs) [13, 34]. Выброс DAMPs в свою очередь способствует формированию стойкого Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа, мишенями для которого служат опухолевые клетки, оставшиеся после хирургической резекции и устойчивые к химиотерапии [34–36]. Ранее, на примере гиперцицин-опосредованной фотодинамической гибели клеток показана возможность развития иммуногенной клеточной гибели [33]. Поскольку все исследованные нами фотосенсибилизаторы накапливаются в эндоплазматическом ретикулуме, потенциально они обладают способностью индуцировать эндоплазматический стресс и гибель клетки по иммуногенному пути [13]. Поэтому дальнейшие исследования способности фотодинамических агентов индуцировать иммуногенную клеточную смерть дадут возможность определить наиболее перспективных кандидатов для терапии глиом.

Заключение

Проведенные исследования позволили определить фотосенсибилизаторы, обладающие незначительной токсичностью по отношению к нормальным клеткам

головного мозга и, следовательно, перспективные для практического применения в фотодинамической терапии глиом. Установленное свойство как нормальных, так и онкотрансформированных клеток глии быстро накапливать фотодинамические агенты всех исследованных групп также может быть использовано при разработке терапевтической стратегии. Обладающими наименьшей токсичностью для нервной ткани, но эффективно проникающими в клетки опухоли являются гиперцицин и фотосенс.

Финансирование исследования. Определение спектральных характеристик фотосенсибилизаторов, анализ темновой токсичности и скорости поступления фотодинамических агентов в клетки нервной системы, сравнительный анализ гибели клеток глиомы и первичных нейрональных культур при воздействии фотосенсибилизаторов выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект 18-15-00279). Исследования особенностей внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов в первичных нейрональных культурах выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-1485.2019.4).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Ostrom Q.T., Gittleman H., Xu J., Kromer C., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol* 2016; 18(suppl_5): v1–v75, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov207>.
2. Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P., Vecchione-Koval T., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro Oncol* 2017; 19(suppl_5): v1–v88, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>.
3. Cohen A.L., Colman H. Glioma biology and molecular markers. In: Raizer J., Parsa A. (editors). *Current understanding and treatment of gliomas. Cancer treatment and research*. Vol. 163. Springer, Cham; 2015; p. 15–30, https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_2.
4. Кубасова И.Ю., Вакуловская Е.Г., Ермакова К.В., Смирнова З.С. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия при лечении злокачественных опухолей головного мозга. *Российский биотерапевтический журнал* 2006; 5(4): 54–67. Kubasova I.Yu., Vakulovskaya E.G., Ermakova K.V., Smirnova Z.S. Fluorescent detection and photodynamic therapy in treatment of brain tumors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* 2006; 5(4): 54–67.
5. Lacroix M., Abi-Said D., Fournay D.R., Gokaslan Z.L., Shi W., DeMonte F., Lang F.F., McCutcheon I.E., Hassenbusch S.J., Holland E., Hess K., Michael C., Miller D., Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95(2): 190–198, <https://doi.org/10.3171/jns.2001.95.2.0190>.

6. Jiang H., Cui Y., Liu X., Ren X., Lin S. Patient-specific resection strategy of glioblastoma multiforme: choice based on a preoperative scoring scale. *Ann Surg Oncol* 2017; 24(7): 2006–2014, <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5843-1>.
7. Sarkaria J.N., Hu L.S., Parney I.F., Pafundi D.H., Brinkmann D.H., Laack N.N., Giannini C., Burns T.C., Kizilbash S.H., Laramy J.K., Swanson K.R., Kaufmann T.J., Brown P.D., Agar N.Y.R., Galanis E., Buckner J.C., Elmquist W.F. Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro Oncol* 2018; 20(2): 184–191, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox175>.
8. Kang J.H., Adamson C. Novel chemotherapeutics and other therapies for treating high-grade glioma. *Expert Opin Investig Drugs* 2015; 24(10): 1361–1379, <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1048332>.
9. de Paula L.B., Primo F.L., Tedesco A.C. Nanomedicine associated with photodynamic therapy for glioblastoma treatment. *Biophys Rev* 2017; 9(5): 761–773, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0293-3>.
10. Di Carlo D.T., Cagnazzo F., Benedetto N., Morganti R., Perrini P. Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. A systematic review and meta-analysis. *Neurosurg Rev* 2019; 42(2): 263–275, <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0928-7>.
11. Kaneko S., Fujimoto S., Yamaguchi H., Yamauchi T., Yoshimoto T., Tokuda K. Photodynamic therapy of malignant gliomas. *Prog Neurol Surg* 2018; 32: 1–13, <https://doi.org/10.1159/000469675>.
12. Li M., Deng H., Peng H., Wang Q. Functional nanoparticles in targeting glioma diagnosis and therapies. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14(1): 415–432, <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8757>.
13. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(12): 860–875, <https://doi.org/10.1038/nrc3380>.
14. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford; 2007; 888 p.
15. Finger V.H. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14(5): 323–328, <https://doi.org/10.1089/clm.1996.14.323>.
16. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Кичигин А.И. Анализ результатов применения флуоресцентной навигации с 5-аминолевулиновой кислотой в хирургии глиом высокой степени злокачественности. *Сибирский онкологический журнал* 2018; 17(2): 18–26. Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Kichigin A.I. Outcomes of 5-ALA fluorescence-guided surgery for high grade G. *Sibirskij onkologiceskij zurnal* 2018; 17(2): 18–26, <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2018-17-2-18-26>.
17. Couldwell W.T., Surnock A.A., Tobia A.J., Cabana B.E., Stillerman C.B., Forsyth P.A., Appley A.J., Spence A.M., Hinton D.R., Chen T.C. A phase 1/2 study of orally administered synthetic hypericin for treatment of recurrent malignant gliomas. *Cancer* 2011; 117(21): 4905–4915, <https://doi.org/10.1002/cncr.26123>.
18. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P. Extracellular ATP and P₂X₇ receptor exert context-specific immunogenic effects after immunogenic cancer cell death. *Cell Death Dis.* 2016; 7:e2097. doi: 10.1038/cddis.2015.411.
19. Zavadskaya T.S. Photodynamic therapy in the treatment of glioma. *Exp Oncol* 2015; 37(4): 234–241, [https://doi.org/10.31768/2312-8852.2015.37\(4\):234-241](https://doi.org/10.31768/2312-8852.2015.37(4):234-241).
20. Medyanik I.A., Volovik M.G., Dydykin A.V., Yashin K.S., Kulakova K.V., Bugrov S.N., Karyakin N.N. Intraoperative thermal control of perifocal edema in photodynamic therapy of malignant brain tumors. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(3): 82–90, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.3.09>.
21. Vedunova M., Sakharova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Y., Dityatev A., Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. *Front Cell Neurosci* 2013; 7(149), <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00149>.
22. Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of brain-derived neurotrophic factor. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 453901, <https://doi.org/10.1155/2015/453901>.
23. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776(1): 86–107, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
24. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(4): 250–281, <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
25. Wank M., Schilling D., Schmid T.E., Meyer B., Gempt J., Barz M., Schlegel J., Liesche F., Kessel K.A., Wiestler B., Bette S., Zimmer C., Combs S.E. Human glioma migration and infiltration properties as a target for personalized radiation medicine. *Cancers* 2018; 10(11): 456, <https://doi.org/10.3390/cancers10110456>.
26. de Leeuw C.N., Vogelbaum M.A. Supratotal resection in glioma: a systematic review. *Neuro Oncol* 2019; 21(2): 179–188, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy166>.
27. Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. М: Изд-во Либроком; 2012; 672 с. Nicholls J.G., Martin A.R., Wallace B.G., Fuchs P.A. *Ot neyrona k mozgu* [From neuron to brain]. Moscow: Izd-vo Librokom; 2012; 672 p.
28. Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 2019; 24(8): 1583, <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
29. Márquez J., Alonso F.J., Matés J.M., Segura J.A., Martín-Rufián M., Campos-Sandoval J.A. Glutamine addiction in gliomas. *Neurochem Res* 2017; 42(6): 1735–1746, <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2212-1>.
30. Rivera J.F., Sridharan S.V., Nolan J.K., Miloro S.A., Alam M.A., Rickus J.L., Janes D.B. Real-time characterization of uptake kinetics of glioblastoma vs. astrocytes in 2D cell culture using microelectrode array. *Analyst* 2018; 143(20): 4954–4966, <https://doi.org/10.1039/c8an01198b>.
31. Брилкина А.А., Дубасова Л.В., Балалаева И.В., Орлова А.Г., Сергеева Е.А., Катичев А.Р., Шахова Н.М. Исследование внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов трех типов в опухолевых клетках человека методом лазерной сканирующей микроскопии. *Технологии живых систем* 2011; 8(8): 32–39. Briлкина A.A., Dubasova L.V., Balalaeva I.V., Orlova A.G., Sergeeva E.A., Katicheva A.R., Shakhova N.M. The study of subcellular distribution of three types of photosensitizers in human cancer cells by laser scanning microscopy. *Tekhnologii zhivyykh sistem* 2011; 8(8): 32–39.
32. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.

Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2005; 2(1): 1–23, [https://doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00030-x](https://doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00030-x).

33. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P. Hypericin-based photodynamic therapy induces surface exposure of damage-associated molecular patterns like HSP70 and calreticulin. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(2): 215–221, <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1184-2>.

34. Mishchenko T., Mitroshina E., Balalaeva I., Krysko O., Vedunova M., Krysko D.V. An emerging role for nanomaterials in increasing immunogenicity of cancer cell death. *Biochim*

Biophys Acta Rev Cancer 2019; 1871(1): 99–108, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.11.004>.

35. Li W., Yang J., Luo L., Jiang M., Qin B., Yin H., Zhu C., Yuan X., Zhang J., Luo Z., Du Y., Li Q., Lou Y., Qiu Y., You J. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death. *Nat Commun* 2019; 10(1): 3349, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11269-8>.

36. Hirschberg H., Berg K., Peng Q. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 2018; 5, <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2018.31>.