

ШУБА І. М.^{1,2} ✉, ЛИЛО В. В.¹, КАРПОВА. І С.^{1,3}, ГЛАВАЦЬКИЙ О. Я.², КОРНЕЛЮК О. І.¹¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0003-4385-4877

² Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. Акад. А. П. Ромоданова НАМН України»,

Україна, 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32, ORCID: 0000-0003-4385-4877, 0000-0003-0889-9762

³ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, ORCID: 0000-0002-8472-6452

✉ irina_shuba@ukr.net

ВПЛИВ ДЕКСТРАНА-70 НА ЦИТОТОКСИЧНУ ДІЮ ЕМАР II НА ГЛІОМНІ КЛІТИНИ *IN VITRO*

Мета. Оцінити за допомогою МТТ-тесту як утворення нанокмпозитного комплексу цитокіну ЕМАР II з декстраном-70 впливає на цитотоксичну дію вільного білка в культурах клітин гліоми різного походження: первинній культурі клітин U251MG та первинній культурі клітин, отриманій з фрагментів пухлин. **Методи.** Рекombінантний поліпептид ЕМАР II було отримано з використанням генно-інженерної біотехнології. Дослідження проводили на лінії клітин гліом людини U251MG та первинних культурах клітин, отриманих з фрагментів пухлин після хірургічного видалення. Життєздатність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту після доби інкубації з ЕМАР II та з комплексом ЕМАР II + декстран-70 у діапазоні концентрацій від 1,0 пкМ до 10 мкМ у стандартних умовах без додавання сироватки в поживне середовище. **Результати.** У наших попередніх роботах було показано, що ЕМАР II проявляє дозозалежні цитотоксичні властивості в діапазоні концентрацій 1,0 пкМ – 10 мкМ на клітини гліом U251MG і в первинних культурах клітин гліом. Крива доза-ефект в усіх випадках має складний патерн. Декстран-70 залежно від типу клітин виявляє здатність дещо послаблювати / посилювати дію останнього. Виявлено підвищену чутливість первинної культури клітин гліом до цитотоксичного впливу комплексу ЕМАР II + декстран-70. **Висновки.** Декстран-70 принципово не впливає на цитотоксичний ефект ЕМАР II, але залежно від типу клітин виявляє здатність дещо послаблювати / посилювати дію останнього. Показано, що первинна культура клітин гліом є більш чутливою до цитотоксичного впливу комплексу ЕМАР II + декстран-70.

Ключові слова: культура клітин гліом, цитокін ЕМАР II, декстран-70, нанокмпозитний комплекс.

Гліоми є найагресивнішими первинними пухлинами головного мозку у дорослих з вкрай несприятливим прогнозом. Лікування гліом базується на комплексному підході, що включає хірургічне лікування, променеву та імунотерапію, а також хіміотерапію препаратами з алкілюючим механізмом дії, який направлений на інгібування мітотичної активності пухлинних клітин [1, 2]. Проте, ці препарати мають високу загальну токсичність. На сьогодні проводиться пошук та відпрацювання нових препаратів, що можуть доповнити стандартну схему лікування [3]. Одним з перспективних підходів є використання білків та пептидів, які можуть специфічно впливати на клітини-мішені та інгібувати патологічні процеси [4]. До таких препаратів відноситься цитокін – рекombінантний поліпептид ЕМАР II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II), попередником якого є білок АІМР1/p43 – компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетази вищих еукаріот [5]. Цитокін ЕМАР II у попередніх дослідженнях виявляв протипухлинні властивості [6]. Проте, при використанні білкових препаратів можуть виникнути проблеми, пов'язані з їх нестабільністю, високою здатністю до агрегації та низьким ступенем розчинності [7, 8]. Для подолання агрегації білків у процесі виробництва білкових терапевтичних засобів використовують різноманітні хімічні речовини, в тому числі декстрини та циклодекстрини [9]. Декстран використовують для захисту і стабілізації унікальної структури білків (наприклад, альбуміну, стрептокінази, інсуліну, гемоглобіну). Як потенційний ліганд для створення комплексу з цитокіном ЕМАР II вибрано декстран 70, який вже давно використовується в медицині і добре відомий. Встановлено, що декстран-70 специфічно зв'язується з досліджуваним рекombінант-

ним білком. Стехіометрія зв'язування декстрана-70 з білком ЕМАР II становить близько 1:1 [10].

Матеріали і методи

Культури клітин гліом. Культивування клітин гліоми людини лінії U251MG (отриману з Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин відділу експериментальних клітинних систем Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України) проводили у культуральних флаконах у CO₂-інкубаторі (ES-160 «Nüve», Туреччина) у стандартних умовах (t = 37⁰C, вміст CO₂ 5 %) у середовищі Ігла (модифікація Дюльбекко (DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium, «Sigma», США) з високим вмістом глюкози. Зміну поживного середовища (2/3 об'єму) проводили кожні 5 діб.

Первинну культуру клітин злоякісних гліом людини отримували з фрагментів пухлин, видалених під час хірургічного втручання. Верифікація гістологічного діагнозу проводилась у відділі нейропатоморфології Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України» WHO-класифікації пухлин центральної нервової системи 2021 року [11]. Виділення пухлинних клітин проводилось у 4 зразках – 2 зразки фрагментів дифузної астроцити 2 ступеня анаплазії (ст. ан.) та 2 зразки фрагментів гліобластоми (ГБ) – гліоми 4 ст. ан. Підрахунок кількості клітин проводили за допомогою світлового мікроскопу та камери Горяєва за включенням 4 % трипанового синього. Оптимізована схема отримання первинної культури клітин злоякісних гліом людини представлена в нашій попередній роботі [12].

МТТ-тест. Це колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин [13]. Цей тест базується на здатності безбарвної солі тетразолію МТТ (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію бромід) у присутності мітохондріальних ферментів живих клітин відновлюватися до нерозчинного формазану фіолетового кольору, що дозволяє оцінити кількість життєздатних клітин. Оптичну густину розчину формазану вимірювали при довжині хвилі 570 нм за допомогою планшетного спектрофотометра UNIPLAN. Життєздатність клітин розраховували як відношення оптичної густини в експерименті після обробки препаратами в процентах до оптичної густини в контролі. Токсичну дію визначали шляхом порівняння результатів МТТ-тесту дослідних та контрольних проб.

Життєздатність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту після доби інкубації з ЕМАР II та з комплексом ЕМАР II + декстран-70 у діапазоні концентрацій від 1,0 пкМ до 10 мкМ у стандартних умовах без додавання сироватки в поживне середовище.

Результати та обговорення

Слід зазначити, що традиційні стратегії лікування раку є недостатньо ефективними щодо злоякісних пухлин головного мозку. Хіміопрепарати з алкілюючим механізмом дії, які наразі застосовуються у лікуванні гліом, мають високу загальну токсичність, що спонукає до пошуку нових менш токсичних препаратів, зокрема серед представників терапевтичних білків, а саме пептидів, які демонструють протипухлинні властивості [4]. Одним з перспективних білків є об'єкт наших досліджень – цитокін ЕМАР II [14, 15]. З використанням сучасних біотехнологій він може бути в препаративних кількостях отриманий у складі відповідних векторних молекул при бактеріальній експресії в клітинах *E. coli* [10].

Цитокін ЕМАР II належить до поліфункціональних білків і спектр його фізіологічної і протипухлинної активності не обмежується одним механізмом. Відомо, що білки також можуть впливати на клітини як цитотоксичні агенти. Проте для рекомбінантного ЕМАР II, а також його комплексу з декстраном-70 здатність до прямої цитотоксичної дії на пухлинні клітини не достатньо досліджена.

Раніше було встановлено, що полісахарид декстран-70 стабілізує протеїн ЕМАР II та перешкоджає процесам агрегації у розчині, що є важливим результатом при створенні стабільних рекомбінантних терапевтичних білків [10].

При додаванні цитокіна ЕМАР II у культуру клітин гліоми людини в усіх випадках (рис. 1–3), виявлено його суттєвий цитотоксичний ефект. Крива доза-ефект у МТТ-тесті має складний патерн у досліджуваному діапазоні концентрацій від 1,024 пкМ до 10,0 мкМ. При цьому простежується двофазний цитотоксичний ефект при оцінці виживання клітин, що залежав не тільки від дози препарату, але і від типу клітин гліоми людини. Як видно з даних рис. 1, цитотоксичний ефект ЕМАР II на клітини перевивної лінії U251GM зафіксовано у діапазоні низьких концентрацій (128 пкМ – 3,2 нМ), а також у діапазоні більш високих концентрацій. Реакція первинних клітин гліоми, отриманих з фрагментів пухлин, на додавання ЕМАР II за патерном

нагадувала таку для перевивної лінії U251GM, але кількісні параметри мали певні особливості, залежно від типу клітин. Так, у випадку дифузної астроцити 2 ст. ан. (рис. 2), максимум цитотоксичної дії у діапазоні низьких концентрацій складав приблизно 30 %, а у діапазоні більш високих концентрацій не перевищував 20 %. Це могло свідчити на користь дещо меншої чутливості цієї культури до цитотоксичного впливу цитокіну ЕМАР II. У той же час первинна культура, отримана з фрагменту ГБ (рис. 3), виявилась більш чутливою до цитотоксичної дії ЕМАР II. Це особливо чітко проявилось у діапазоні вищих концентрацій. Певні відмінності в реакції первинної культури клітин гліоми людини на вплив ЕМАР II можна пояснити персональними особливостями хворих, серед яких можуть бути більш чутливі / резистентні пацієнти, а також генетичними відмінностями пухлин та гетерогенністю досліджуваного матеріалу.

Декстран-70 є полімером глюкози бактеріального походження, який давно використовується в медичних цілях як допоміжний та як самостійний фармакологічний препарат з антиагрегатними властивостями. Отримання комплексу ЕМАР II + декстран-70 є важливим кроком

на шляху впровадження цього перспективного протипухлинного цитокіну у якості терапевтичного препарату. В наших експериментах виявилось, що цитотоксичний вплив принципово не відрізняється від дії індивідуального рекомбінантного ЕМАР II, але має певні особливості залежно від типу гліомних клітин. Так, чутливість клітин перевивної лінії U251GM до впливу комплексу ЕМАР II + декстран-70 виявилась меншою (рис. 1).

При цьому для 7 з 11 застосованих концентрацій кількісні показники виживання клітин перевищували аналогічні дані для ЕМАР II, однак різниця не виходила за межі 10 %. Первинна культура, отримана з фрагменту дифузної астроцити 2 ст. ан. (рис. 2), навпаки, виявилась більш чутливою до дії комплексу з декстраном 70, про що свідчили більші значення інгібування росту культури для 8-ми з 11 застосованих доз.

Для клітин ГБ (рис.3), матеріал якої відзначається значною гетерогенністю, односпрямована дія декстрану-70 у комплексі з ЕМАР II не проявилась, хоча за певних концентрацій, як в діапазоні низьких, так і вищих доз, цитотоксичний ефект комплексу був виражений сильніше.

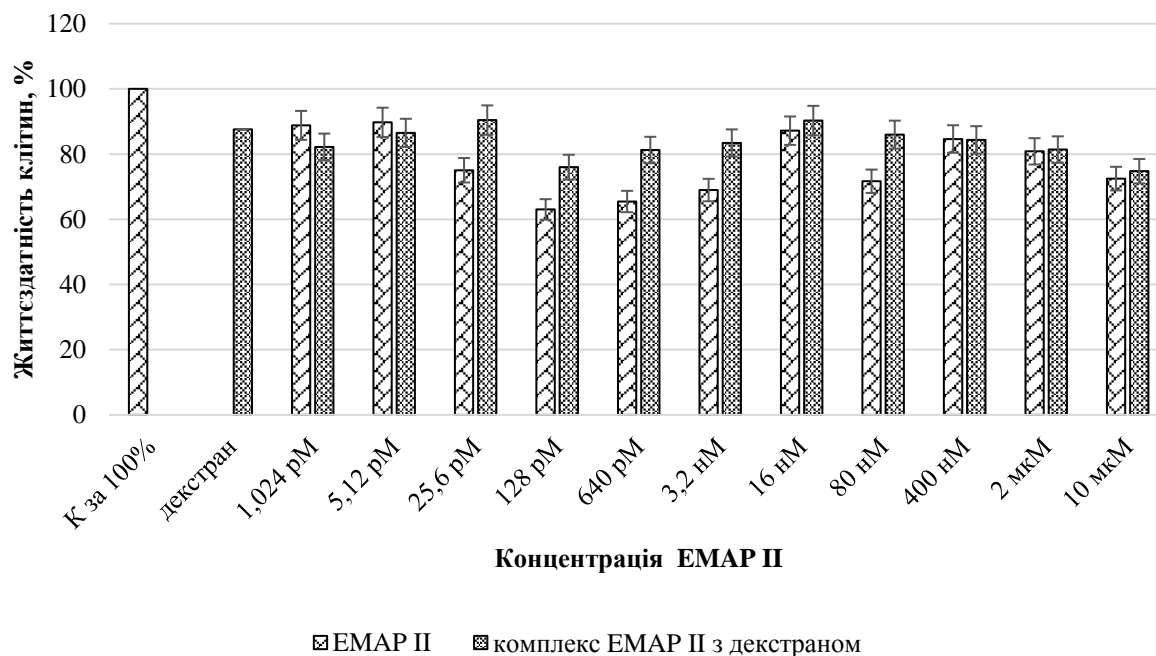


Рис. 1. Вплив різних концентрацій ЕМАР II та нанокompatного комплексу ЕМАР II + декстран-70 на життєздатність гліомних клітин людини первинної лінії U251GM за результатами МТТ-тесту. Середнє для двох експериментів.

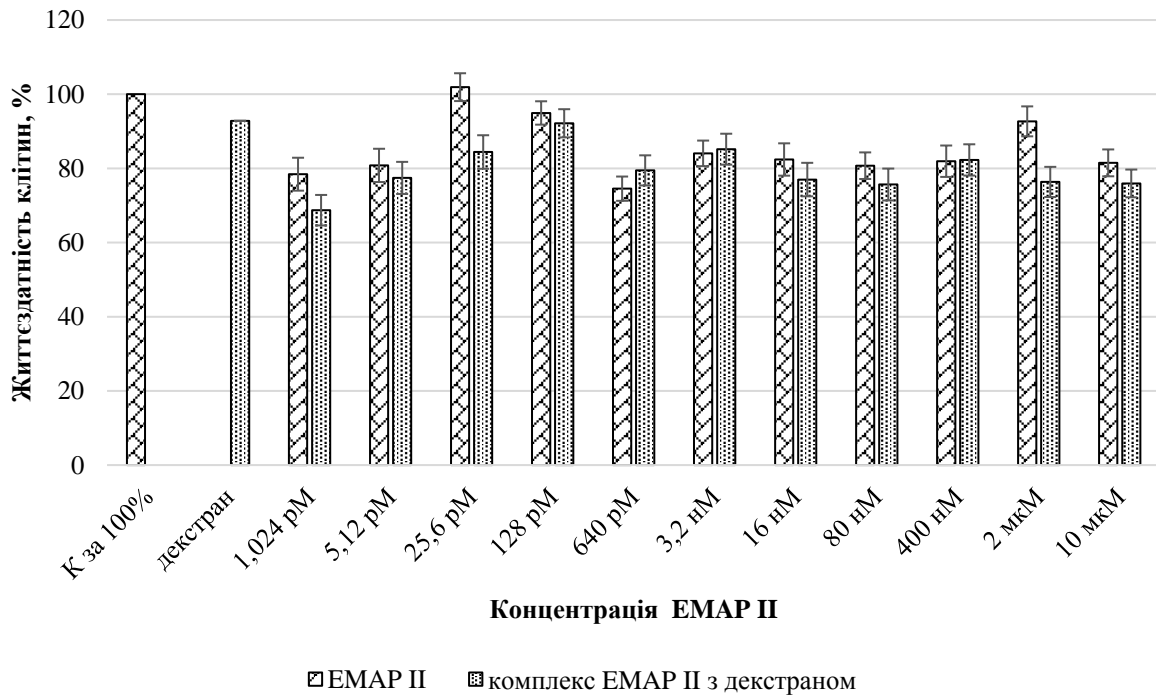


Рис. 2. Вплив різних концентрацій ЕМАР II та нанокмпозитного комплексу ЕМАР II + декстран-70 на життєздатність гліомних клітин первинної культури за результатами МТТ-тесту. Первинна культура клітин гліом отримана з фрагменту пухлини після хірургічного втручання (дифузна астроцитом 2 ст. ан.). Середнє для двох експериментів.

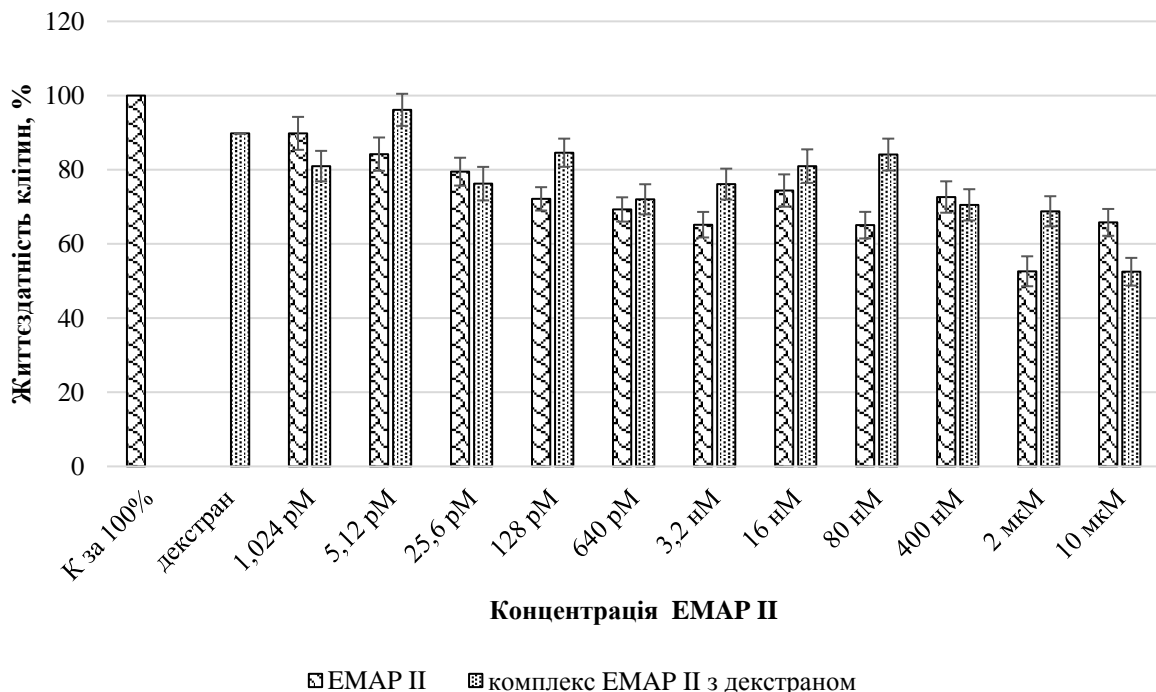


Рис. 3. Вплив різних концентрацій ЕМАР II та нанокмпозитного комплексу ЕМАР II + декстран-70 на життєздатність гліомних клітин первинної культури за результатами МТТ-тесту. Первинна культура клітин гліом отримана з фрагменту ГБ після хірургічного втручання. Середнє для двох експериментів.

Таким чином, декстран-70 принципово не впливає на цитотоксичний ефект ЕМАР II, але залежно від типу клітин виявляє здатність дещо послаблювати / посилювати дію останнього. Відомо, що процес злоякісної трансформації клітин супроводжується значними змінами структури клітинної поверхні. В разі первинної культури спектр таких змін може бути значно більшим, порівняно з культурою, яка багато пасажів перевивається в стандартних умовах.

Висновки

Декстран 70 принципово не впливає на цитотоксичний ефект ЕМАР II, але залежно від типу клітин виявляє здатність дещо послаблювати / посилювати дію останнього. Показано, що первинна культура клітин гліом є більш чутливою до цитотоксичного впливу нанокмпозитного комплексу ЕМАР II + декстран-70.

References

1. Arruebo M., Vilaboa N., Sáez-Gutierrez B. et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*. 2011. Vol. 3. P. 327–330. doi: 10.3390/cancers3033279.
2. Khranovska N. M., Skachkova O. V., Horbach O. I., Zhukova V. M., Hlavatskyi O. Ia., Zemskova O. V., Khmelnytskyi H. V., Shuba I. M. Pershyi dosvid vykorystannia imunoterapii na osnovi dendrytnykh klityn v kompleksnomu likuvanni khvorykh na hlioblastomu. *Klinichna onkologiya*. 2019. Vol. 9 (2). P. 80–86. doi: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.38.22510. [in Ukrainian]
3. Russo S., Cinausero M., Gerratana L., Bozza C., Iacono D., Driol P., a Deroma L., Sottile R., Fasola G., Puglisi F. Factors affecting patient's perception of anticancer treatments side-effects: an observational study. *Expert Opin Drug*. 2014. Vol. 13 (2). P. 139–150. doi: 10.1517/14740338.2013.830710.
4. Xie M., Liu D., Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biol*. 2020. doi: 10.1098/rsob.200004.
5. Tas M. P., Murray J. C. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996. Vol. 28 (8). P. 837–841. doi: 10.1016/1357-2725(96)00038-6.
6. Berger A. C., Tang G., Alexander H. R., Libutti S. K. Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived cytokine that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis. *J Immunother*. 2000. Vol. 23 (5). P. 519–527. doi: 10.1097/00002371-200009000-00002.
7. Hofmann M., Winzer M., Weber C., Gieseler H. Prediction of Protein Aggregation in High Concentration Protein Solutions Utilizing Protein-Protein Interactions Determined by Low Volume Static Light Scattering. *J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 105 (6). P. 1819–1828. doi: 10.1016/j.xphs.2016.03.022.
8. Roberts C. J. Protein aggregation and its impact on product quality. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2014. Vol. 30. P. 211–217. doi: 10.1016/j.copbio.2014.08.001.
9. Wu F., Zhou Z., Su J., Wei L., Yuan W., Jin T. Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins. *Nanoscale Res Lett*. 2013. Vol. 8 (1). doi: 10.1186/1556-276X-8-197.
10. Kolomiets L. A., Vorobyova N. V., Lozhko D. M., Zayets V. N., Kornelyuk A. I. Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with dextran-70 polysaccharide. *Pharmacological Reports*. 2020. Vol. 72 (1). P. 238–245. doi: 10.1007/s43440-019-00016-x. [in Ukrainian]
11. Louis D. N., Perry A., Wesseling P. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*. 2021. Vol. 23 (8). P. 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
12. Shuba I. M., Lylo V. V., Karpova I. S., Hlavatskyi O. Ia., Korneliuk O. I. Pervynna kultura klityn zloiakysnykh hliom liudyny yak model dlia doslidzhennia protyupukhlynnoho vplyvu preparative. *Visn. Ukr. tov-va henetykiv i seleksioneriv*. 2019. Vol. 17 (2). P. 196–203. [in Ukrainian]
13. Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L. L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018. Vol. 120. P. 159–167. doi: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
14. Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dybrovsky A., Murray C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Byopolymers*. 1999. Vol. 15 (2). P. 168–172. [in Ukrainian]
15. Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Grigorenko V. N., Kornelyuk A. I. Cooperative antitumor effect of recombinant polypeptide EMAP II and flutamide on human prostate cancer xenografts. *Experim. Oncology*. 2011. Vol. 33 (4). P. 231–234. [in Ukrainian]

SHUBA I. M.^{1,2}, LYLO V. V.¹, KARPOVA I. S.^{1,3}, GLAVATSKYI O. Y.², KORNELYUK O. I.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 150

² The State Institution "Romodanov Neurosurgery Institute, NAMS of Ukraine",
Ukraine, 04050, Kyiv, Mayborody str., 32

³ Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

INFLUENCE OF DEXTRAN-70 ON THE CYTOTOXIC EFFECT OF EMAP II ON GLIOMA CELLS *IN VITRO*

Aim. To evaluate with the use of the MTT test how the formation of a nanocomposite complex of the cytokine EMAP II with dextran-70 affects the cytotoxic effect of the free protein in glioma cell cultures of different origins: a standart culture U251MG cells and a primary culture of cells obtained from tumor fragments. **Methods.** The recombinant polypeptide EMAP II was obtained using gene engineering biotechnology. The study was conducted on the standard human glioma cell line U251MG and on primary cell cultures obtained from tumor fragments after surgical removal. Cell viability was determined using the MTT test. The cells were cultivated for a day with the different concentrations from 1.0 pM to 10 µM of EMAP II and the EMAP II + dextran-70 complex in serum-free standard DMEM growth medium. **Results.** In our previous works, it has been shown that EMAP II exhibited dose-dependent cytotoxic properties in the concentration range of 1.0 pM – 10 µM on U251MG glioma cells and in primary cell cultures. The dose-effect curve in all cases has a complex pattern. Dextran-70 does not fundamentally affect the cytotoxic effect of EMAP II, but depending on the dose and type of cells, it shows the ability to slightly weaken/enhance the effect of the free protein. An increased sensitivity of the primary culture of glioma cells to the cytotoxic effect of the EMAP II + dextran-70 complex was revealed. **Conclusions.** Dextran-70 does not fundamentally affect the cytotoxic effect of EMAP II, but depending on the dose and type of cells, it shows the ability to slightly weaken/enhance the effect of the latter. **Keywords:** glioma cell culture, cytokine EMAP II, dextran-70, nanocomposite complex.