

ШУБА І. М.^{2✉}, ЛИЛО В. В.¹, КАРПОВА І. С.¹, ГЛАВАЦЬКИЙ О. Я.², КОРНЕЛЮК О. І.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0001-8626-3028, 0000-0002-8472-6452, 0000-0003-0146-2832

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

✉ shuba.iryana@gmail.com

ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ГЛІОБЛАСТОМИ ПІД ВПЛИВОМ РІЗНИХ КОНЦЕНТАЦІЙ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОГО-МОНОЦИТАКТИВУЮЧОГО ПОЛІПЕПТИДА ІІ (ЕМАР ІІ) ЗА ДОПОМОГОЮ ФАРБУВАННЯ ТРИПАНОВИМ СИНІМ

Мета. Підтвердження встановленого раніше (МТТ-тестом) цитотоксичного потенціалу поліпептида ЕМАР ІІ відносно первинної культури клітин гліобластоми за допомогою незалежного методу з використанням барвника трипанового синього, який широко застосовується для селективного фарбування клітин. **Методи.** Первинну культуру клітин, отриману з фрагментів тканини злоякісної гліоми після хірургічного втручання, обробляли ЕМАР ІІ у різних концентраціях. Для визначення кількості життєздатних клітин, присутніх у клітинній суспензії, застосовували тест на виключення барвника трипанового синього. При цьому живі клітини, які мають непошкоджені клітинні мембрани, залишаються прозорими через виключення барвника, тоді як мертві клітини поглинають барвник і забарвлюються в голубий колір. **Результати.** Було зафіксовано цитотоксичний ефект ЕМАР ІІ, який проявився в діапазоні високих концентрацій препарату 10 мкМ, 2 мкМ та 640 пМ. **Висновки.** Тест на виключення трипанового синього через свою простоту і доступність може бути використаний для попередніх скринінгових досліджень впливу ЕМАР ІІ на клітини злоякісної гліоми, але він значно поступається МТТ-тесту за чутливістю та інформативністю.

Ключові слова: цитокін ЕМАР ІІ, первинна культура клітин гліоми, цитотоксичність, тест на виключення барвника трипанового синього.

Гліобластома (ГБ) є найбільш поширеною формою онкологічної патології головного мозку з несприятливим прогнозом та смертністю в короткі терміни від початку захворювання [1]. Сучасна стратегія лікування гліом, яка передбачає проведення хірургічного втручання з наступними променевою та хіміотерапією, не є достатньо ефективною через високу інфільтративність

і надзвичайну стійкість трансформованих клітин до променевої та хіміотерапії, що неминуче призводить до рецидиву після хірургічної резекції. Ця ситуація спонукає до пошуку малотоксичних і більш ефективних засобів протипухлинного впливу.

Одним з перспективних підходів до лікування злоякісних новоутворень є застосування терапевтичних білків і пептидів, які відзначаються специфічністю і меншою токсичністю порівняно з хіміопрепаратами. На сьогодні знайдено велику кількість таких біомолекул [2, 3]. Автори багатьох робіт дійшли висновку, що білкові препарати можуть впливати на ракові клітини як цитотоксичні агенти, які діють за різними механізмами, зокрема сприяють лізису клітинної мембрани, або індукують апоптоз [4]. Крім того, згадані білки виявляють схильність до синергізму з іншими відомими протипухлинними препаратами.

До терапевтичних білків можна віднести ендотеліальний моноцитаактивуючий поліпептид ІІ (ЕМАР ІІ), у якого виявлено цитокинову активність. ЕМАР ІІ бере участь у різноманітних патофізіологічних процесах в організмі та діє на різні типи клітин, зокрема ендотеліальні та імунні клітини, а також фібробласти. Було показано, що ЕМАР ІІ індукує апоптоз у проліферуючих ендотеліальних клітинах. Він також демонструє протизапальні та антиангіогенні властивості відносно ендотелію у стані росту [5–7].

У нашій попередній роботі [8] було встановлено за допомогою МТТ-тесту ще одну функцію багатофункціонального білка ЕМАР ІІ, а саме дозозалежні цитотоксичні властивості в культурі клітин гліоми U 251 MG. Цитотоксичний ефект ЕМАР ІІ проявився також у первинній культурі, отриманій безпосередньо від пацієнтів пі-

ся хірургічного втручання. В останньому випадку цитотоксичність залежала від ступеня анаплазії, а також, за припущенням, від індивідуальних особливостей пацієнтів.

Оскільки вважається, що нові факти варто підтвердити різними методами ми поставили за мету перевірити цитотоксичний потенціал поліпептида ЕМАР II відносно первинної культури клітин гліобластоми за допомогою незалежного методу з використанням барвника трипанового синього, який широко застосовується для селективного фарбування клітин.

Матеріали і методи

Культура клітин. Первинні клітинні лінії було отримано з фрагментів тканин злоякісних гліом після хірургічного втручання [8]. У цьому дослідженні використано два типи зразків фрагментів гліоми з різним ступенем анаплазії: дифузні гліоми 3 ступеня анаплазії та гліобластоми. Рекombінантний протеїн ЕМАР II експресували у *Escherichia coli* T. Escherich, очищали та досліджували, як описано раніше [8, 9]. Тест на виключення барвника трипанового синього використовували для визначення кількості життєздатних клітин, присутніх у клітинній суспензії. До суспензії клітин, оброблених різними концентраціями ЕМАР II, додавали 0,4 % розчин барвника на 5 хв і ретельно перемішували в кожній лунці імунологічного планшета шляхом піпетування. Відомо, що мембрани живих клітин не пропускають барвник, тоді як мертві клітини його поглинають. Кількість клітин, які мають прозору цитоплазму (життєздатні клітини) або забарвлену цитоплазму (нежиттєздатні клітини) визначали візуально за допомогою світлового мікроскопа та камери Горяєва [10]. Виживаність клітин визначали як відсоток живих клітин порівняно з контролем. Статистичний аналіз. Усі досліди проводили в трьох повторях. Відмінності між необробленим контролем та кожним варіантом дослідження аналізували за допомогою t-критерія Стьюдента. Середнє значення та стандартне відхилення розраховували в програмі Excel (Microsoft, США).

Результати та обговорення

Перевагами первинних культур пухлинних клітин є збереження індивідуальних характеристик конкретного пацієнта. У розробці та використанні

сучасного арсеналу протипухлинних препаратів пріоритетними є дослідження саме індивідуальної чутливості до дії рекомендованих речовин. Це підвищує актуальність застосування в якості моделі первинних культур клітин злоякісних пухлин, зокрема гліом, отриманих з фрагментів матеріалу після хірургічного видалення.

Раніше нами з використанням МТТ-тесту було показано дозозалежну цитотоксичну дію цитокина ЕМАР II в культурі клітин гліоми людини U 251 MG, а також в первинній культурі гліомних клітин, отриманих від пацієнтів. Крива доза-ефект мала один статистично значущий мінімум в діапазоні низьких, а інший — в діапазоні високих концентрацій. Такий двофазний ефект на виживання клітин гліоми може свідчити про здатність ЕМАР II взаємодіяти з різними рецепторами, які інакше реагують на низькі і, відповідно, високі його концентрації [8].

У представлений роботі (рис. 1) при фарбуванні клітин трипановим синім патерн цитостатичної дії ЕМАР II відрізняється від такого порівняно з МТТ-тестом відсутністю вираженого цитостатичного ефекту в діапазоні низьких концентрацій. У цьому діапазоні не спостерігається дозозалежного результату, а показники життєздатності клітин мають різноспрямований характер. Дозозалежний цитостатичний ефект проявляється лише за дії високих концентрацій ЕМАР II (2 мкМ та 10 мкМ), проте він менш виражений, ніж у випадку МТТ-тесту.

Цікаво відмітити (рис. 2), що у випадку клітин гліобластоми навіть в діапазоні високих концентрацій ЕМАР II дозова залежність була менш вираженою, ніж у гліомах 3 ступеня анаплазії. Це може бути пов'язано як з індивідуальними особливостями хворих, так і з генетичними відмінностями між клітинами гліобластом та дифузних гліом 3 ступеня анаплазії.

Відповідь пухлинних клітин на вплив препаратів залежить від багатьох генетичних та епігенетичних факторів як на рівні клітин так і організму. Реакція первинної культури може розглядатись як інтегральний прогностичний показник відповіді пухлини конкретного пацієнта на проведену терапію. Даний показник слід враховувати при плануванні, проведенні та інтерпретації результатів як впливу рекомендованого препарату, так і комплексного лікування в цілому.

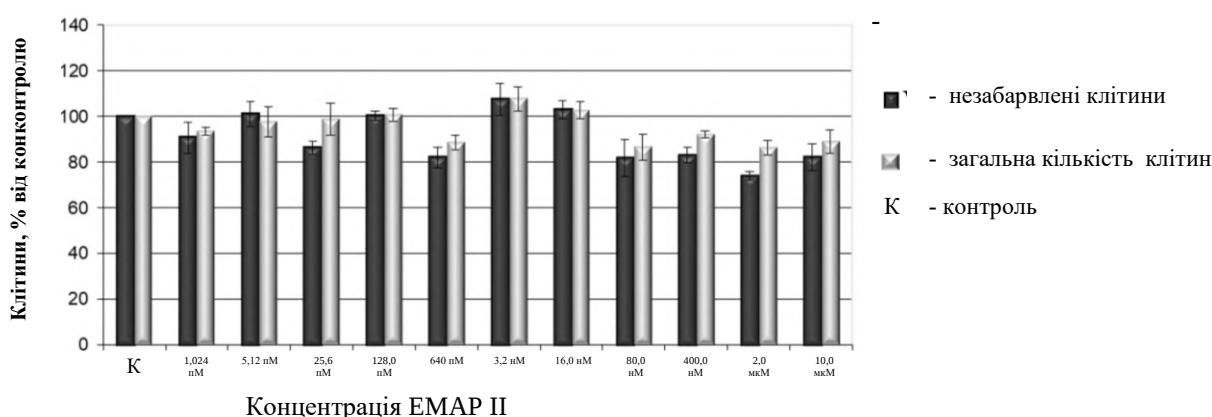


Рис. 1. Цитотоксична дія різних концентрацій цитокіну ЕМАР II на первинну культуру клітин, отриману з фрагментів тканин злоякісних гліом (дифузні гліоми 3 ступеня анаплазії) після хірургічного видалення. Тест на виключення трипанового синього.

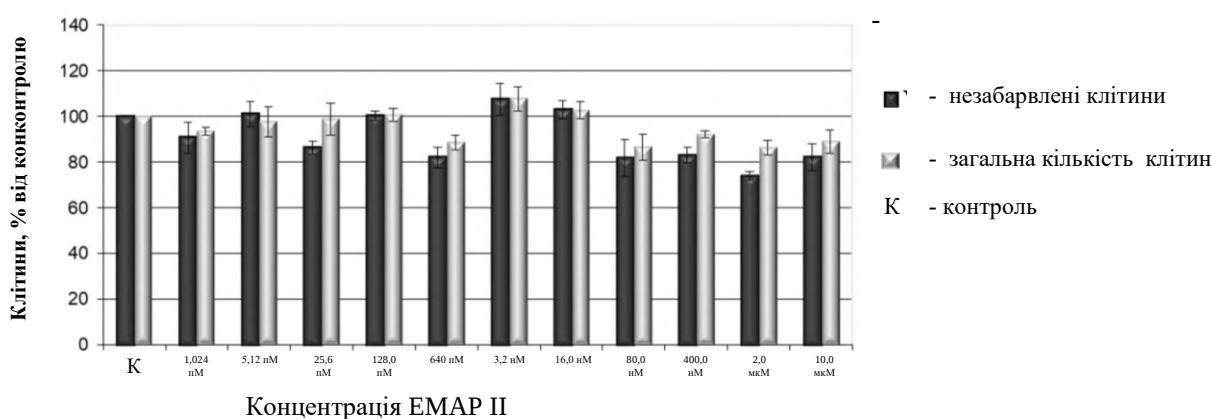


Рис. 2. Цитотоксична дія різних концентрацій цитокіну ЕМАР II на первинну культуру клітин, отриману з фрагментів тканини злоякісної гліоми (гліобластоми) після хірургічного видалення. Тест на виключення трипанового синього.

Тест на виключення трипанового синього широко використовується через його доступність і простоту, але має певні обмеження, такі як низька точність і залежність від оператора. Крім того, можливі помилки у процесі піпетування та перенесення матеріалу, а також підрахунку клітин у камері Горяєва [11]. Цими обмеженнями можна пояснити значно меншу чутливість цього тесту у наших дослідженнях цитотоксичного потенціалу цитокіну ЕМАР II порівняно з МТТ-тестом [8].

Висновки

1. За допомогою тесту на виключення трипанового синього підтверджено наявність у цитокіну ЕМАР II цитотоксичного потенціалу.

2. Цей тест значно поступається МТТ-тесту за чутливістю і інформативністю щодо впливу ЕМАР II на клітини злоякісної гліоми.

3. Трипановий синій може бути використаний для попередніх скринінгових досліджень цитотоксичної дії ЕМАР II на первинні культури клітин гліоми з обов'язковим підтвердженням результатів МТТ-тестом.

References

1. Louis D. N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*. 2021. Vol. 23, No. 8. P. 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
2. Hilchie A. L., Hoskin D. W., Power Coombs M. R. Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides. In: *Matsuzaki K. (eds) Antimicrobial Peptides. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_9.
3. Eghtedari M., Jafari Porzani S., Nowruzi B. Anticancer potential of natural peptides from terrestrial and marine environments: A review. *Phytochem. Lett.* 2021. 42. P. 87–103. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.02.008>.

4. Xie M., Liu D., Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biol.* 2020. <https://doi.org/10.1098/rsob.200004>.
5. Schwarz M. A., Kandel J., Brett J. Stern D. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. *J Exp Med.* 1999. 190 (3). P. 341–354.
6. Van Horssen R., Eggermont A. M., ten Hagen T. L. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006. 17 (5). P. 339–348.
7. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis. *Exp Oncol.* 2004. 26 (4). P. 250–255.
8. Shuba I. M., Lylo V. V., Karpova I. S., Glavatskyi O. Ya., Kornelyuk A. I. Cytotoxic effect of the endothelial-monocyte activating polypeptide II on glioma cells *in vitro*. *Biopolymers and Cell.* 2024. Vol. 40, No. 4. P. 245–328. <https://doi.org/10.7124/bc.000B08>.
9. Dubrovsky A. L., Brown Jn., Kornelyuk A. I., Matsuka G. Kh. Bacterial Expression of Full Length and Truncated Forms of Cytokine EMAP2 and Cytokine Like Domain of Mammalian Tyrosyl tRNA Synthetase. *Biopolym Cell.* 2000. 16. P. 229–235. [in Ukrainian]
10. Curr Protoc Immunol. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. 2015. 111. A3.B.1–A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
11. Kim J. S., Nam M. H., An S. S., Lim C. S., Hur D. S., Chung C. Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. *J Clin Lab Anal.* 2011. 25. P. 90–94. <https://doi.org/10.1002/jcla.20438>.

SHUBA I. M.², LYLO V. V.¹, KARPOVA I. S.¹, 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

DETERMINATION OF VIABILITY OF PRIMARY GLIOBLASTOMA CELL CULTURE UNDER THE INFLUENCE OF VARIOUS CONCENTRATIONS OF ENDOTHELIAL MONOCYTE-ACTIVATING POLYPEPTIDE II (EMAP II) USING TRYPAN BLUE STAINING

Aim. Confirmation of the previously established (by MTT assay) cytotoxic potential of the EMAP II polypeptide against primary glioblastoma cell culture using an independent method of trypan blue exclusion test, which is widely used for selective cell staining. **Methods.** Primary cell culture obtained from malignant glioma tissue fragments after surgery was treated with EMAP II at various concentrations. The trypan blue dye exclusion test was used to determine the number of viable cells present in the cell suspension. In this case, living cells, which have intact cell membranes, remain transparent due to the exclusion of the dye, while dead cells absorb the dye and turn blue. **Results.** A dose-dependent cytotoxic effect of EMAP II was recorded, which was manifested in the range of high drug concentrations 10 μ M, 2 μ M, 640 pM. **Conclusions.** The trypan blue exclusion test, due to its simplicity and availability, can be used for preliminary screening studies of the effect of EMAP II on malignant glioma cells, but it is significantly inferior to the MTT-test in sensitivity and informativeness.

Keywords: cytokine EMAP II, primary glioma cell culture, cytotoxicity, trypan blue dye exclusion test.