

ПЕРВИННА КУЛЬТУРА КЛІТИН ЗЛОЯКІСНИХ ГЛІОМ ЛЮДИНИ ЯК МОДЕЛЬ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОГО ВПЛИВУ ПРЕПАРАТІВ

І. М. ШУБА¹, В. В. ЛИЛО², І. С. КАРПОВА^{2,3}, О. Я. ГЛАВАЦЬКИЙ¹, О. І. КОРНЕЛЮК²

¹Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України»
Україна, 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, м. Київ,
вул. Академіка Заболотного, 150

³Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: irina_shuba@ukr.net

Мета. Метою нашої роботи була оптимізація схеми отримання первинної культури клітин злоякісних гліом, які можуть бути моделлю для персоналізованого підходу у виборі тактики хіміотерапевтичного впливу. **Методи.** Використовували стандартну лінію клітин гліоми U-251MG та клітини, що були отримані в результаті механічної дезагрегації фрагментів пухлин III–IV ст. ан. до поодиноких ізольованих клітин. **Результати.** Проведено порівняльний аналіз результатів культивування стандартної лінії клітин гліоми U-251MG та первинної культури клітин злоякісних гліом людини. Запропоновано оптимізовану схему отримання первинних культур клітин злоякісних гліом людини, виділених з фрагментів гліальних пухлин, отриманих під час хірургічного втручання. **Висновки.** На сьогодні все більше віддають перевагу методам індивідуального визначення хіміочутливості перед призначенням стандартних схем хіміотерапії і саме первинна культура пухлинних клітин, з нашої точки зору, може бути використана для тестування відповіді на вплив хіміопрепаратів.

Ключові слова: клітини злоякісних гліом, первинна культура, стандартна лінія клітин

Вступ. Онкологічні захворювання сьогодні вважаються найбільш поширеною патологією після інсульту та ішемії міокарда з вкрай несприятливим прогнозом. Причому з кожним роком кількість онкологічних пацієнтів неухильно зростає. За прогнозами Міжнародного агентства з вивчення раку (International agency for research of cancer) та ВООЗ у світі до 2035 р. щорічна первинна захворюваність на рак зросте більш ніж на 70 % у порівнянні з 2012 р (14,1 млн. випадків) (Globocan, 2012).

На сьогодні існує багато теорій виникнення раку. Одна з них базується на уявленнях, що рак є результатом послідовного накопичення мутацій певних генів, що призводить до активації експресії генів онкогенних білків або інактивзації експресії генів відповідних білків-супресорів (Stepanenko et al., 2012). Це обумовлює таргетну терапію, націлену на інактивацию таких онкогенних білків або блокування сигнального шляху за їх участі, що має призвести до регресії пухлини.

Останнім часом все більше уваги привертає нова теорія раку, що базується на еволюційних змінах каріотипу (evolutionary cytogenetic cancer theory), тобто хромосомній нестабільності (ХН). Теорія розроблена групами американських дослідників П. Дюсберга та Г. Хенга (Duesberg, 2004).

В деяких роботах відмічено парадоксальний зв'язок між високим рівнем ХН і поліпшеним прогнозом порівняно з хворими на пухлини з помірним рівнем ХН.

Ймовірно, аномальне розходження однієї або декількох хромосом під час клітинного поділу (низький рівень ХН) сприяє туморогенезу, а порушення поділу більшої кількості хромосом (високий рівень ХН) негативно впливає на життєздатність ракових клітин. Відома здатність цитотоксичних та таргетних препаратів, що використовуються в клініці, посилювати зростання ХН. Це може сприяти селекції резистентних варіантів пухлинних клітин, а також генерувати нові мутації при рецидиві пухлини через посилення рівня ХН (Stepanenko et al., 2012).

Незважаючи на активний розвиток клінічних та лабораторних методів досліджень в нейроонкології, гліоми, як і раніше, залишаються найпоширенішими і, водночас, найагресивнішими первинними пухлинами головного мозку у дорослих.

Гліоми головного мозку складають більшість (50–60) % первинних пухлин центральної нервової системи у дорослих та включають цілий спектр різних за рівнем клітинної диференціації та злویкісності пухлин (Зозуля і др., 2007; Zeng et al., 2015). Для злویкісних гліом характерна висока інфільтративність, ці пухлини надзвичайно стійкі до променевої та хіміотерапії, що неминуче призводить до рецидиву після хірургічної резекції. Вказані властивості, притаманні злویкісним гліомам, є причиною відсутності відчутних покращень у лікуванні пацієнтів протягом довгого часу (Зозуля і др., 2007).

Лікування гліом головного мозку базується на комплексному підході, що включає хірургічне лікування, променеву та хіміотерапію препаратами з алкілюючим механізмом дії, спрямованим на пригнічення мітотичної активності пухлинних клітин, проте такі препарати мають досить високу загальну токсичність. Наразі проводиться пошук та відпрацювання нових цільових нетоксичних лікарських препаратів, що можуть доповнити стандартну схему лікування.

Зручною моделлю для дослідження протипухлинної дії препаратів є стандартні лінії клітин. Сучасний протокол попереднього скринінгу потенційних протипухлинних препаратів, що прийнятий в 1990 р. Національним Інститутом Раку (National Cancer Institute, NCI, США), включає тестування речовин на панелі з 60 клітинних ліній людини пухлинного походження та отримав назву NCI60 (Shoemaker, 2006).

Застосування моделей *in vitro* дозволяє провести скринінг потенційних протипухлинних речовин з метою прогнозування ефективності їх

застосування та виключення неефективних сполук (Svirnovski, 2013). Клітинна лінія — це сукупність клітин, отримана з первинної культури шляхом збільшення кількості клітин після декількох генерацій з переважанням клітин або ліній диференціювання з високим темпом зростання і високою однорідністю клітинної популяції (Данилова, 2010).

До стандартних клітинних ліній гліом, що найбільш часто використовуються в дослідженнях (або роботах) різних центрів, відносять С6 (клітини гліоми щура) та лінії клітин гліом людини (U-251MG, U-273MG, SF-268, U-87MG, U-373MG). Відома, що довгострокове культивування клітинних ліній призводить до іморталізації клітин (Попов і др., 2009).

Постійні клітинні лінії представлені клітинами, що мають клональне походження і можуть використовуватися тривалий час. Більшість постійних культур клітин отримано із злویкісно трансформованих клітин, що визначає їх здатність до необмеженого поділу. У порівнянні з нетрансформованими клітинами того ж типу, в таких культурах спостерігаються зміни в регуляції клітинного циклу, експресії генів та інших морфофункціональних властивостях (Фрешни, 2010).

Дослідження зміни каріотипу в клітинних лініях на різних етапах процесу іморталізації дозволили дійти висновку, що саме хромосомна нестабільність (ХН) є рушійною силою іморталізації клітини. Ступінь ХН та генетичної гетерогенності корелює з туморогенним потенціалом клітинних ліній (Stepanenko et al., 2015).

На сьогодні багато авторів довели переваги методів індивідуального визначення хіміочутливості перед призначенням стандартних схем хіміотерапії (Главацкий А. Я. і др., 2006). Тестування комбінацій хіміотерапевтичних засобів на культурах клітин дає можливість вивчити їх адитивні, синергічні або антагоністичні ефекти, вибрати найбільш раціональну схему терапії не тільки залежно від гістологічного типу новоутворення, ступеня його злویкісності, але й з урахуванням індивідуальної чутливості пацієнтів (Svirnovski, 2013). У зв'язку з цим все більше уваги приділяється дослідженню впливу протипухлинних препаратів на первинній культурі пухлинних клітин, які отримані в результаті деагрегації (ферментативного, механічного, хімічного) вихідної тканини до одиночних ізольованих клітин та підтримуються упродовж кількох субкультивувань (Семенова, 2008). Такі культури клітин максимально відповідають вихідним

властивостям пухлинних клітин кожного окремого пацієнта (Galderisi, 2009). Спираючись на високу кореляцію відповідей, отриманих при використанні первинних культур клітин, з клінічними показниками (реакція пухлин, стан пацієнтів, тривалість періодів безрецидивної та загальної виживаності), перспективним вважають подальший розвиток таких персоніфікованих підходів при розробці тактики лікування злоякісних новоутворень (Strickland, 2013; Главацький і др., 2001).

Мета роботи — оптимізація схеми отримання первинної культури клітин злоякісних гліом з фрагментів пухлин, вилучених під час хірургічного втручання.

Матеріали і методи

Культивування клітин гліоми людини U-251MG (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 в CO₂-інкубаторі (ES-160 «Nüve», Туреччина) в стандартних умовах (t = 37 °C, вміст CO₂ у середовищі складав 5 %, при зволоженні) в середовищі Ігла (модифікація Дюльбекко (DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium, «Sigma», США) з високим вмістом глюкози та із додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки («Sigma», США). Зміну поживного середовища (2/3 об'єму) проводили кожні 5 діб.

Отримання первинної культури клітин злоякісних гліом людини. Виділення пухлинних клітин проводилось в 9 зразках (5 зразків фрагментів Gr III (анапластична астроцитом) та 4 зразки фрагментів Gr IV (гліобластома); верифікація гістологічного діагнозу проводилась у відділі нейропатоморфології Державної установи «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України» згідно з WHO-класифікацією пухлин центральної нервової системи 2016 року (David et al., 2016).

Нами запропонована оптимізована схема отримання первинної культури клітин злоякісних гліом людини. (Схема 1)

1. Матеріал для дослідження забирали безпосередньо під час операції (5 зразків фрагментів Gr III (анапластична астроцитом) та 4 зразки фрагментів Gr IV (гліобластома)).

2. Впродовж однієї години після видалення в стерильних умовах тканину відмивали від залишків крові, видаляли некротичні зони, подрібнювали мікроножицями та отримували су-

спензію клітин пухлини у фізіологічному розчині методом механічної дисоціації багатократним піпетуванням (0,9 % NaCl).

Схема 1. Оптимізована схема отримання первинної культури клітин злоякісних гліом людини

1. Отримання фрагменту пухлини після хірургічного видалення

2. Препарування фрагменту пухлини (видалення судин, зон некрозу та інше)

3. Отримання суспензії пухлинних клітин (5 x 10⁹ кл/мл)

4. Перевірка зразків клітин на життєздатність

5. Попередня інкубація клітин (DMEM, 10 % FBS, t = 37 °C, 5 % CO₂, зволоження, 24 год) (5 x 10⁶ кл/мл)

6. Перевірка адгезії клітин на поверхні флакону або чашки (5–7 клітин у полі зору) після 24 год попередньої інкубації.

3. Отриману суспензію центрифугували при 500 об/хв протягом 3–5 хвилин з метою позбавлення фрагментів тканин. Надосадову фракцію центрифугували при 1000 об/хв протягом 5 хв, осад клітин ресуспендували в поживному середовищі для подальшої інкубації в стандартних умовах.

4. Підрахунок кількості клітин проводили за допомогою світлового мікроскопу та камери Горяєва за включенням 4 % трипанового синього. Живі клітини трипановим синім не фарбуються — барвник не здатний проникнути в клітину через клітинну мембрану. При пошкодженні мембрани трипановий синій забарвлює клітинне ядро в інтенсивно синій колір, такі клітини вважаються мертвими (Strober, 2001).

5. Для подальшої роботи відбирали зразки, що містили не менше 80–85 % живих клітин. Отриману гетерогенну суспензію клітин культивували в поживному середовищі у культуральних флаконах (об'єм 40 мл) клітини вносили в кількості 5 x 10⁶ кл/мл, об'єм поживного середовища становив 5 мл, інкубацію проводили в стандартних умовах протягом однієї доби, після чого проводили зміну 2/3 об'єму поживного середовища для видалення як загиблих клітин так і клітин, що не адгезували на поверхні флакону.

У подальшому проводили зміну 2/3 об'єму поживного середовища кожні 5 діб.

6. За допомогою світлової мікроскопії підраховували кількість клітин, що адгезували на поверхні флакону, (5–7 клітин у полі зору). В подальшому проводили зміну поживного середовища 2/3 від об'єму кожні 5 діб, вели спостереження за формуванням зони росту, утворенням моношару клітин (10–14 доба інкубації).

Результати та обговорення

Для відпрацювання умов культивування нами використано стандартну лінію клітин гліоми людини U-251MG. Як відомо, постійна лінія клітин U-251MG була отримана з фрагменту злюкисної астроцити (III–IV ст. ан.) методом експлантата у 1960 році (U-251 MG — Kerfast, 2019). Клітини цієї лінії експресують гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) протягом багатьох клітинних пасажів, також експресують рецептори епідермального фактора росту (EGFR), що дозволяє досліджувати вплив інгібіторів, та мають метильований промотор гену MGMT, у зв'язку з чим досить часто використовуються для дослідження впливу саме хімотерапевтичних засобів з алкілюючим механізмом дії.

На рис. 1 показано утворення моношару клітин U-251MG на сьому добу культивування в стандартних умовах — стадія активної проліферації, клітини видовжені, рівномірно розподілені, відростки гліальних клітин формують сіткоподібні структури.

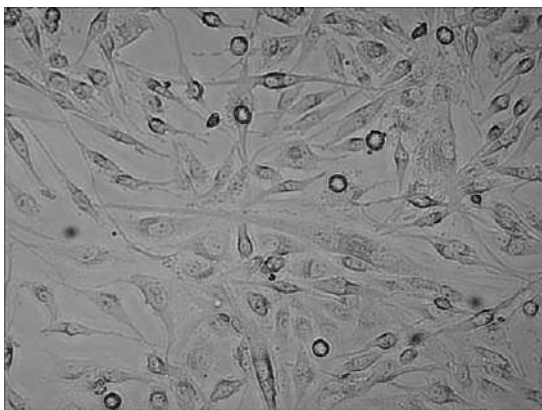


Рис 1. Клітини лінії U251MG (анапластична астроцитома людини), 7-ма доба культивування (Світлова мікроскопія, NikonECLIPSE TS100 x 100, нативна культура клітин, без забарвлення).

Для отримання первинних культур злюкисних гліом у попередніх дослідках на етапі відпрацювання методу проводили виділення пух-

линних клітин з тканинних фрагментів із додаванням трипсину на етапі препарування фрагменту тканин та отримання гетерогенної суспензії пухлинних клітин (Схема 1, етап 2) з подальшим додатковим етапом ресуспендування осаду клітин з метою відмивання від залишків трипсину (схема 1, етап 3). У наших дослідках із застосуванням трипсину отримували незначний вихід клітин, адгезія клітин на поверхні була незначною, моношар утворювався повільно. В нашій подальшій роботі використовували метод механічної дисоціації клітин.

Оскільки в нашій роботі ми використовували зразки тканини пухлин, отримані під час хірургічного видалення, існує ймовірність, що матеріал може мати як вірусну (Лисяний і др., 2008) так і бактеріальну контамінацію. В літературних даних часто зустрічаються рекомендації щодо додавання антибіотиків (пеніцилін, гентаміцин та інші в концентрації 100–150 од/мл) у середовище для культивування (Фрешни, 2010) для запобігання інфікування. Наш досвід свідчить про те, що при чіткому дотриманні стерильності на всіх етапах культивування у доданні антибіотиків немає потреби (Семенова, 2018), крім того в присутності антибіотиків на етапі виділення та в першу добу культивування клітини погано адгезують на поверхні чашки або флакону для культивування. У деяких наших спостереженнях моношар клітин починав формуватись лише на третій тиждень культивування — два випадки дослідів з фрагментами пухлин IV ст. ан. та один випадок III ст. ан. В одному випадку IV ст. ан. взагалі не вдалось отримати культуру клітин, незважаючи на достатню кількість живих клітин, що були виділені з фрагменту пухлини.

На рис. 2 та 3 представлена первинна культура клітин гліоми, отримана з фрагменту пухлини анапластичної астроцити (III ст. ан.). На рис. 2 представлено клітини на 5-у добу культивування — поодинокі клітини, відносно рівномірно розподілені по поверхні дна флакону, деякі клітини ще мають округлу форму, інші видовжені, кількість клітин в полі зору майже не змінилась після адгезії на поверхні.



Рис. 2. Клітини анапластичної астроцитоми, отриманих з фрагменту пухлини (III ст. ан), пацієнт Г., чол. 53 р. (Світлова мікроскопія, NikonECLIPSE TS100 x 100, нативна культура клітин, без забарвлення) 5-а доба культивування.

На рис. 3 представлено формування колоній клітин на 7–8-у добу культивування — клітини мають видовжену форму, формують відростки, утворюють клітинні контакти, формується зона росту. Деякі клітини (у полі зору до 15–20 %) після 2 тижнів культивування мають округлу форму, без відростків, кількість мертвих клітин може складати до 7–10 %. За нашими спостереженнями, з тканин анапластичної астроцитоми вдається в більшості випадків ($\frac{3}{4}$ досліджених зразків) отримати первинну культуру клітин в більш короткі строки (до 10–12 діб інкубації), ніж з фрагментів тканин гліобластом (15–18 діб інкубації, в одному випадку культуру клітин не вдалось взагалі отримати).

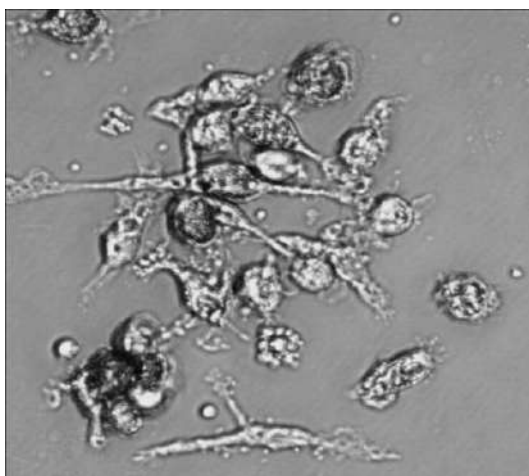


Рис. 3 Формування колоній клітин, 7-ма доба культивування. (Світлова мікроскопія, NikonECLIPSE TS100 x 100, нативна культура клітин, без забарвлення).

Приклад первинної культури злоякісних гліомних клітин представлено на рис. 4 (IV ст. ан., гліобластома). На 10-у добу культивування кількість клітин збільшилась відносно вихідного рівня у 3–4 рази у полі зору, клітини подовженої форми, мають щільні міжклітинні контакти, відростки клітин формують сіткоподібну структуру, мертві клітини або завмерлі майже не візуалізуються.

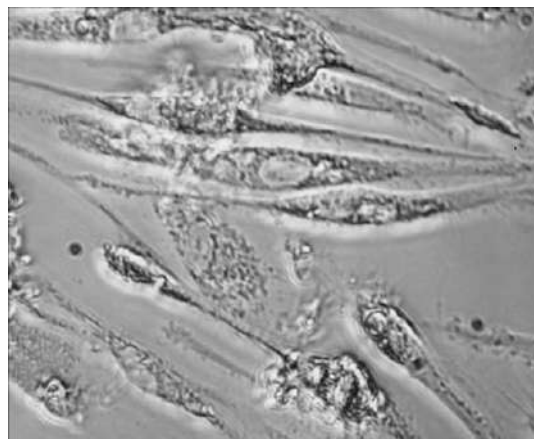


Рис. 4. Клітини гліобластоми (IV ст. ан.), пацієнт Ц., жінка, 43 р., 10 доба інкубації; (NikonECLIPSE TS100 x 200, нативна культура клітин, без забарвлення).

Відомо, що клітини нервової тканини формують розгалужену сітку з численними нейрональними відростками, тому є досить чутливими до механічного впливу, рН середовища та температурного режиму (Семенова, 2018). Оскільки в роботі використовували зразки фрагментів тканин пухлин, отримані під час хірургічного видалення, не виключено, що на здатність до утворення первинної культури клітин злоякісних гліом може впливати, крім зазначених факторів, також проведене попереднє медикаментозне лікування пацієнтів. Можливо, що саме цим можна пояснити невдалі спроби отримати культури клітин з деяких представлених фрагментів пухлин.

На основі відомих даних та результатів власних спостережень нами представлено зведену порівняльну характеристику властивостей стандартних клітинних ліній та первинних культур клітин гліом людини, отриманих з фрагментів тканин пухлин (табл. 2).

Таблиця 2. Порівняльна характеристика властивостей стандартних клітинних ліній та первинних культур клітин гліом людини

Характеристика	Клітинна лінія	Первинна культура
Походження	окремі культивовані клітини гліоми	отримана з фрагменту тканина пухлини після хірургічного втручання та підтримуються до першого субкультивування
Культуральне середовище	стандартне	стандартне та модифіковане
Утворення моношару	утворюється протягом 5-7 діб	утворюється до 2 тижнів
Кількість пасажів	необмежена	до утворення моношару
Гетерогенне клітинне оточення	відсутнє	присутнє на перших етапах, до змін поживного середовища
Вплив нейро-ендокринної та імунної системи (Фрешни 2010; Семенова, 2008).	відсутній	зберігається на перших етапах на епігенетичному рівні
Спектр рецепторів, чутливих до дії біологічно активних речовин (Хоруженко, 2011)	обмежений	наближений до відповідних тканин пацієнта *
Геномна нестабільність (генні мутації) (Stepanenko A.A. et al., 2015)	висока	відповідає рівню тканини пухлини *
Хромосомна нестабільність (анеуплоїдія, хромосомні аберації) (Li L. et al., 2009)	за тривалого культивування відбувається стабілізація	відповідає рівню тканини пухлини *
Переваги	клітини з встановленими характеристиками, легко підтримуються в стандартних умовах, гарна відтворюваність відповіді на вплив досліджуваної речовини	придатні для визначення індивідуальної чутливості/резистентності до дії лікарських препаратів

Примітка: * — Власна думка, яка базується на відомих фактах (Фрешни, 2010) і власних спостереженнях, що за кілька клітинних поколінь не могло відбутись значних змін на генетичному рівні та наступної селекції які б принципово вплинули на генотип злоякісно трансформованих клітин, отриманих від пацієнта.

Як видно з табл. 2, перевагами первинних культур пухлинних клітин є максимальна наближеність до пухлинної тканини та збереження індивідуальних характеристик конкретного пацієнта. Незважаючи на досить значні успіхи на сучасному етапі в розробці та застосуванні багатого арсеналу протипухлинних препаратів, актуальним залишається дослідження саме індивідуальної чутливості до дії рекомендованих препаратів, що є можливим при застосуванні в якості моделі первинних культур клітин злоякісних гліом, отриманих з фрагментів пухлин, вилучених після хірургічного видалення. Відповідь пухлинних клітин на вплив хіміопрепаратів 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 хіміотерапію. Даний показник слід враховувати при плануванні, проведенні та інтерпретації

результатів як комбінованої хіміотерапії так і комплексного лікування в цілому.

Висновки

На сьогодні все більше віддають перевагу методам індивідуального визначення хіміочутливості перед призначенням стандартних схем хіміотерапії і саме первинна культура пухлинних клітин, з нашої точки зору, може бути використана для тестування відповіді на вплив хіміопрепаратів.

Оскільки в літературі було показано, що стандартні лінії клітин під час тривалого культивування трансформуються досить значною мірою та набувають характеристик, що не притаманні вихідним клітинам нами запропоновано оптимізована схема отримання первинної культури культури злоякісних гліомних клітин

Перелік літератури

1. International agency for research of cancer (Globocan) [Electronic resource]: *The World of Health Organization*. 2012. URL: <https://gco.iarc.fr/>
2. Stepanenko A. A., Kavsan V. M. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory. *Biopolymers and Cell*. 2012. Vol. 28, N. 4. P. 267–280. doi: 10.7124/bc.000059.
3. Duesberg P., Fabarius A., Hehlmann R. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life*. 2004. N 2. P. 65–81. doi: 10.1080/15216540410001667902.
4. Zeng T., Cui D., Gao L. Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies. *Front Biosci*. 2015. N 20. P. 1104–1115. doi: 10.2741/4362.
5. Зозуля Ю. А., Васильева И. Г., Главацкий А. Я. и др. Глиомы головного мозга. (под. ред. Ю. А. Зозули). Київ: УИПК «ЕксОб», 2007. 630 с.
6. Фениксов В. М. Клинические и молекулярно-биологические прогностические факторы глиом головного мозга: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2010. 19 с.
7. Shoemaker R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6, N 10. P. 813–823. doi: 10.1038/nrc1951.
8. Svimovski A. I. Leukemia therapy personalization: role of some laboratory technologies. *Medical News*. 2013; 9: 6–11.
9. Попов Б. В., Петров Н. С., Михайлов В. М. Спонтанная трансформация и иммортализация мезенхимальных стволовых клеток в культуре *in vitro*. *Цитология*. 2009. Т. 51, N 2. С. 91–102.
10. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток. Практическое руководство / Под. ред. Р. Я. Фрешни. Биом. 2010. С. 714.
11. Stepanenko A., Andreieva S., Korets K. Mykytenko D., Huleyuk N., Vasstzky Y., Kavsan V. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015. Vol. 771, N 2. P. 56–69 URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.2016>
12. Главацкий А. Я., Волченкова И. И., Гладкий А. В., Семенова В. М. Исследование цитотоксической активности полиплатиллена и его композиции с фторурацилом *in vitro*. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Шупіка*. 2006, вип. 15, кн. 2. С. 13–20.
13. Семенова В. М. Выделение и культивирование клеток нервной ткани. *Методы культивирования клеток* / Под ред.: Г. П. Пинаева, М. С. Богдановой. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. Санкт-Петербург. 2008. 157–176.
14. Galderisi F., Stork L., Li J., Mori M., Mongoue Tchokote S., Huang J. Flow cytometric chemosensitivity assay as a predictive tool of early clinical response in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. 2009. Vol. 53. P. 543–550. doi: 10.1002/pbc.22119
15. Strickland S. A., Raptis A., Hallquist A. Correlation of the microculture-kinetic drug-induced apoptosis assay with patient outcomes in initial treatment of adult acute

myelocytic leukemia. *Leuk. Lymph*. 2013. Vol. 54. P. 528–534. doi: 10.3109/10428194.2012.722217

16. Главацкий А. Я., Волченкова И. И., Семенова В. М., Хмельницький Г. В., Щалимов С. А., Майданевич Н. Н., Стайно Л. П. Эффект воздействия производного платины с дезоксирибонуклеиновой кислотой на выживаемость культивируемых клеток опухолей головного мозга. *Физика живого*. 2001. Вып. 9, N 2, С. 7–13.
17. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001 doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
18. David N. L., Arie P., Guido R., Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W. K., Ohgaki H., Wiestler O. D., Kleihues P., Ellison D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.
19. Лисяний Н. И., Орлов Ю. А., Кулик А. В., Лисяний А. Н., Потапова А. И. Диагностика вирус-ассоциированных опухолей головного мозга. *Укр. Нейрохірург. Журн.*, Київ. 2008, N 1, С. 27–31.
20. Семенова В. М., Стайно Л. П. Методические особенности культивирования клеточной нервной ткани. Аспекты применения метода культивирования тканей в нейробиологии и нейроонкологии / Под ред. проф. В. М. Семеновой. Киев: Интерсервис, 2018. С. 20–35.
21. Данилова Р. К. Руководство по гистологии. Т. 1, 2-ое издание, исправленное и дополненное / Под редакцией Р. К. Данилова, Санкт-Петербург: СпецЛит. 2010. С. 821
22. U-251 MG Glioblastoma Cell Line. URL: <https://www.kerafast.com/product/1790/u-251-mg-glioblastoma-cell-line> (дата звернення: 09.10.2019).
23. Хоруженко А. И. Двух- и трехмерная культура клеток. *Biopolymers and Cell*. 2011. Vol. 27. N 1., P. 17–24.
24. Li L., McCormack A. A., Nicholson J. M., Fabarius A., Hehlmann R., Sachs R. K. Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009. Vol. 188. P. 1–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.08.016>.

References

1. International agency for research of cancer (Globocan) [Electronic resource]: *The World of Health Organization*. 2012. URL: <https://gco.iarc.fr/>
2. Stepanenko A. A., Kavsan V. M. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory. *Biopolymers and Cell*. 2012. Vol. 28, N. 4. P. 267–280. doi: 10.7124/bc.000059
3. Duesberg P., Fabarius A., Hehlmann R. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life*. 2004. N 2. P. 65–81. doi: 10.1080/15216540410001667902
4. Zeng T., Cui D., Gao L. Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies. *Front Biosci*. 2015. N 20. P. 1104–1115. doi: 10.2741/4362.

5. Zozulia Yu. A., Vasileva I. G., Glavatskyi A. Ya. et al. Gliomas of the brain. (edited by a Yu. A. Zozulia). Kyiv: UYPK «EksOb», 2007. 630 s.
6. Feniksov V. M. Clinical and molecular biological prognostic factors of brain gliomas: avtoref. dis.. kand. med. nauk. Moskva, 2010. 19 s.
7. Shoemaker R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6, N 10. P. 813–823. doi: 10.1038/nrc1951.
8. Svimovskii A. I. Leukemia therapy personalization: role of some laboratory technologies. *Medical News*. 2013; 9: 6–11.
9. Popov B. V., Petrov N. S., Mikhaylov V. M. Spontaneous transformation and immortalization of mesenchymal stem cells in an *in vitro* culture. *Tsitologiya*. 2009. T. 51, N 2. S. 91–102.
10. Freshney R. J. Culture of animal cells. A Manual of Basic Technique / fifth edition R. Jan Freshney. Bionom. 2010. S. 714.
11. Stepanenko A., Andreieva S., Korets K., Mykytenko D., Huleyuk N., Vasstzky Y., Kavsan V. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015. Vol. 771, N 2. P. 56–69 URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.2016>
12. Glavatskyi A. Ya., Volchenskova Y. Y., Gladkyy A. V., Semenova V. M. *In vitro* study of the cytotoxic activity of polyplatilen and its composition with fluorouracil. Zbirnyk naukovykh prats' spivrobitnykiv NMAPO im. P. Shupika. 2006, vyp.15, kn. 2. S. 13–20.
13. Semenova V. M. Isolation and cultivation of nerve tissue cells. *Cell Culture Methods* / edited by a G. P. Pinaeva, M. S. Bogdanovoy. — SPb.: Izd-vo Politekh. un-ta. Sankt-Peterburg. 2008. 157–176.
14. Galderisi F., Stork L., Li J., Mori M., Mongoue-Tchokote S., Huang J. Flow cytometric chemosensitivity assay as a predictive tool of early clinical response in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. 2009. Vol. 53. P. 543–550. doi: 10.1002/psc.22119.
15. Strickland S. A., Raptis A., Hallquist A. Correlation of the microculture-kinetic drug-induced apoptosis assay with patient outcomes in initial treatment of adult acute myelocytic leukemia. *Leuk. Lymph*. 2013. Vol. 54. P. 528–534. doi: 10.3109/10428194.2012.722217.
16. Glavatskyi A. Ya., Volchenskova Y. Y., Semenova V. M., Khmelniyskiy G. V., Shchalimov S. A., Maydanevich N. N., Stayno L. P. The effect of a platinum derivative with deoxyribonucleic acid on the survival of cultured brain tumor cells. *Fizika zhivogo*. 2001. Vyp. 9, N 2, S. 7–13.
17. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001 doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
18. David N. L., Arie P., Guido R., Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W. K., Ohgaki H., Westler O. D., Kleihues P., Ellison D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.
19. Lisiany N. I., Orlov Iu. A., Kulik A. V., Lisiany A. N., Potapova A. I. Diagnosis of virus-associated brain tumors. *Ukr. Neurosurg. Journ*. Kyiv. 2008, N 1, C. 27–31.
20. Semenova V. M., Stayno L. P. Methodological features of the cultivation of cells of the nervous tissue. Aspects of the application of tissue cultivation in neurobiology and neurooncology / edited by a prof. V. M. Semenova. Kiev: Interservis, 2018. S. 20–35.
21. Danilova R. K. *Histology Guide T. 1*, 2nd edition, revised and updated / Edited by a R. K. Danilova, Sankt-Peterburg: SpetsLit. 2010. S. 821.
22. U-251 MG Glioblastoma Cell Line. URL: <https://www.kerafast.com/product/1790/u-251-mg-glioblastoma-cell-line> (дата звернення: 09.10.2019).
23. Khoruzhenko A. I. Two- and three-dimensional cell culture. *Biopolymers and Cell*. 2011. Vol. 27. N 1, P. 17–24.
24. Li L., McCormack A. A., Nicholson J. M., Fabarius A., Hehlmann R., Sachs R. K. Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009. Vol. 188. P. 1–25. doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.08.016.

THE PRIMARY CULTURE OF MALIGNANT GLIOMA CELLS AS A MODEL FOR THE STUDY OF ANTI-TUMOR ACTIVITY OF SUBSTANCES

I. M. Shuba¹, V. V. Lylo², I. S. Karpova^{2,3},
O. Y. Glavatskyi¹, O. I. Kornelyuk²

¹The State Institution «Romodanov Neurosurgery Institute, NAMS of Ukraine»
Ukraine, 04050, Kyiv, Mayborody st., 32

²Institute of Molecular Biology and Genetics
NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akadem. Zabolotnogo st., 150

³Institute of Plant Physiology and Genetics
NAS of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska st., 31/17
e-mail: irina_shuba@ukr.net

Aim. The aim of our work was to optimize the scheme of obtaining primary cell culture of malignant gliomas, which can be a model for a personalized approach in the selection of chemotherapeutic exposure tactics. **Methods.** The standard glioma cell line U-251MG and cells obtained as a result of mechanical disaggregation of Gr III–IV tumor fragments were used. an. to single isolated cells. **Results.** A comparative analysis of the results of cultivation of the standard glioma cell line U-251MG and the primary cell culture of malignant gliomas. An optimized scheme for obtaining primary cultures of human malignant glioma cells isolated from glial tumor fragments obtained during surgery is proposed. **Conclusions.** Today, more and more preferred methods of individual determination of chemosensitivity over the appointment of standard chemotherapy regimens and it is the primary culture of tumor cells, from our point of view, can be used to test the response to the effect of chemotherapy.

Keywords: malignant glioma cells, primary culture, standard cell line.