

УДК 616-018:54

DOI: 10.20535/1810-0546.2017.6.119387

Ю.А. Наумчук^{1,2}, В.Б. Максименко^{1*}, С. Кая²¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна²Університет Лойола в Чикаго, Чикаго, США

ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕСТІВ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ДЛЯ СКРИНІНГУ ГЛІОПРОТЕКТОРНИХ СПОЛУК У КУЛЬТУРІ ПЕРВИННИХ АСТРОЦИТІВ ГОЛОВКИ ЗОРОВОГО НЕРВУ ЩУРА

Background. Optic nerve head astrocytes (ONHAs) are the major glia cell type in the non-myelinated optic nerve head where they contribute to extracellular matrix synthesis. Pathological changes in glaucoma include reactive astrocytosis, a process characterized by altered astrocyte gene and protein expression and extracellular matrix remodeling. ONHAs are highly sensitive to mechanical and oxidative stress resulting in the initiation of axon damage early during pathogenesis. Furthermore, ONHAs are crucial for the maintenance of retinal ganglion cell physiology and function. Therefore, glioprotective strategies with the goal to preserve and/or restore the structural and functional viability of ONHA to slow glaucoma and related pathologies are of high clinical relevance.

Objective. The aim of the paper is the development of standardized methods for the systematic advancement of glioprotective strategies using plate reader-based assays determining cellular viability, plate-reader based proliferation and the intracellular redox state.

Methods. In our work we used primary culture of ONHAs as a model system. The oxidative stress was induced by *t*BHP. Reactive oxygen species (ROS) were measured by the DCFDA assay. For cell viability tests we used the optimized lactate dehydrogenase (LDH) release assay, as well as the MTT and Calcein-AM uptake assays.

Results. The half-maximal effect (EC_{50}) of *t*BHP on ONHAs ROS levels in the DCFDA assay was $192.1 \pm 15.7 \mu\text{M}$. The measurement of cellular viability of ONHAs after *t*BHP-induced oxidative stress showed $EC_{50} = 156.9 \pm 3.8 \mu\text{M}$ in the Calcein-AM uptake assay. In the MTT assay, the EC_{50} for *t*BHP was $138.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$, and shifted to $192.7 \pm 2.8 \mu\text{M}$ with $100 \mu\text{M}$ Trolox pre-treatment of ONHA. In the LDH release assay, the EC_{50} for *t*BHP was $146.9 \pm 4.9 \mu\text{M}$ and $246.3 \pm 7.3 \mu\text{M}$ for the control and Trolox conditions respectively.

Conclusions. Our results provide feasibility data for the plate-reader based screening for novel glioprotectants using primary ONHA culture.

Keywords: glaucoma; optic nerve head astrocytes; oxidative stress; reactive oxygen species; viability assays.

Вступ

Глаукома оптична нейропатія, також відома як глаукома, являє собою групу мультифакторних зорових розладів, для яких характерні перебудова голівки зорового нерву (ГЗН), атрофія зорового нерву (ЗН) і деградація гангліонарних клітин сітківки (ГКС) [1, 2]. Патологічна тріада, яка виникає при глаукомі, своєю чергою призводить до повільної прогресуючої втрати зору, починаючи з периферії зорового поля і закінчуючи повною втратою зору [1].

Підвищений внутрішньоочний тиск (ВОТ) як результат зниженого відтоку водянистої вологи через трабекулярну сітку або через увеосклеральний шлях відтоку є найбільш важливим клінічним біомаркером глаукоми [3]. Проте гіпотеза про підвищений ВОТ як визначальний чинник розвитку глаукоми була всюди відхилена, особливо з урахуванням того факту, що для значної кількості осіб із нормальним ВОТ характерна глау-

кома патологія, в той час як у багатьох осіб із підвищеним ВОТ не проявляються ознаки оптичної нейропатії [1, 3].

На сьогодні загально визнаним є твердження, що у формуванні глаукоми задіяні декілька механізмів, у результаті яких відбувається загибель ГКС. Ці механізми включають хронічну або транзиторну ішемію, окисний стрес, втрату трофічних чинників і синоптичну дисфункцію. Нині єдиним фармацевтичним підходом до лікування глаукоми є контроль очної гіпертензії. У тих випадках, коли препарати, що знижують ВОТ і впливають на відтік водянистої вологи і/або її вироблення, не здатні уповільнити розвиток захворювання, використовують хірургічні втручання: лазерну трабекулопластику, трабекулоектомію та імплантацію штучних дренажних шунтів [3].

Незважаючи на те що методики нейропротекції успішно зарекомендували себе в доклінічних моделях, фактично всі з більш ніж 100 клі-

* corresponding author: maksymenko.vitaliy@gmail.com

нічних досліджень з нейропротекції при глаукомі не увінчалися успіхом, а тому підходи, спрямовані на зниження ВОТ, досі залишаються актуальними [4, 5].

Астроцити голівки зорового нерву (АГЗН) є основним типом гліальних клітин у немієлінізованій ГЗН, де вони критично необхідні для синтезу зовнішньоклітинного матриксу (ЗКМ) [6]. При глаукомі для АГЗН характерні зміни в експресії генів і білків, що призводить до перебудов у ЗКМ, які є найбільш ранніми змінами при глаукомі [3, 6, 7].

Проте внутрішньоклітинні сигнальні шляхи в АГЗН значною мірою залишаються невивченими. Виходячи з їх спеціалізованої ролі в трофічній і структурній підтримці ГЗН, існує велика вірогідність того, що їх властивості відмінні від астроцитів головного мозку, основною функцією яких є гомеостатичний контроль іонного балансу і трофічна підтримка нейронів. Дослідження в цій області також уповільнені дефіцитом придатних експериментальних інструментів і платформ для тестування гліопротекторного потенціалу новітніх кандидатів лікарських засобів. Наприклад, у багатьох дослідженнях використовуються неонатальні або ранні постнатальні культури астроцитів, які недостатньою мірою відтворюють клітинні властивості при цьому віковому захворюванні. Описані первинні культури людських АГЗН, отримані з тканин дорослих донорів (таких як очі, вилучені з трупа), мають обмеження по їх застосуванню в моделях гризунів, які критично важливі в ранніх доклінічних дослідженнях ефективності новітніх лікарських засобів для лікування глаукоми. Більше того, методи випробувань клітинної життєздатності, розроблені для зазначених вище культур клітин, а також для первинної культури нейронів, не були оптимізовані і не пройшли валідації для АГЗН.

Постановка задачі

У попередніх роботах нами було отримано первинну культуру дорослих АГЗН щура, що може бути використана як модель гліопротекції [8]. Метою цієї роботи є оптимізація і валідація тестування життєздатності та функціональних властивостей АГЗН для високопродуктивного скринінгу гліопротекторних властивостей новітніх кандидатів лікарських засобів для лікування глаукоми.

Матеріали та постачальники

Для первинної культури АГЗН усі буфери та середовища були отримані від Lonza (Walkers-

ville, MD), за винятком трипсин-ЕДТА (Media Tech Inc., Manassas, VA). Продукти сироватки були придбані у Gibco® (Life Technologies, Carlsbad, CA). Пластик для культури клітин був отриманий від TPP® (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland; sourced from Midwest Scientific, St. Louis, MO). Реактиви для покриття дна з оптичного скла для 96-лункових планшетів були отримані від Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Покривні скельця (12 мм), вкриті полі-L-лізином, були придбані в BD Biosciences (SanJose, CA). Трет-бутилгідропероксид – tBHP (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) – додавали до культурального середовища для хімічної індукції оксидативного стресу. Тести DCFDA, Кальцеїн-AM і MTT були придбані в Life Technologies (Carlsbad, CA).

Детальний опис методів

Індукція оксидативного стресу та обробка лікарськими засобами

У попередніх роботах ми описували отримання первинної культури АГЗН щура [8]. Враховуючи роль гострого та хронічного клітинного оксидативного стресу в деяких нейродегенеративних захворюваннях, включаючи глаукому, ми перевірили можливість використання первинних АГЗН як платформи для скринінгу кандидатів лікарських засобів для гліопротекції. Ми використали хімічно індукований, екзогенний оксидативний стрес як засіб впливу *in vitro* для тесту прототипного антиоксиданту Тролокс. У попередніх роботах ми провели валідацію стандартного оксиданту, tBHP (Sigma Aldrich Corp.), для дослідження гліопротекції за допомогою планшетного рідера з використанням культури клітин астрогліоми С6 [9].

АГЗН було засіяно на 96-лункові планшети (TPP, Midwest Scientific, St. Louis, MO) з густиною 7500 клітин на лунку. Після 48 год клітини піддавали збільшеним концентраціям tBHP (Sigma Aldrich Corp.) протягом 5 год. Для дослідження гліопротекції клітини були попередньо оброблені (протягом 1 год) прототипним антиоксидантом Тролокс (100 мкМ в 0,1 об. % етанолі; Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO). Після цього були проведені вимірювання рівня реактивних форм кисню, життєздатності та проліферації клітин у планшет-рідері.

Методи вимірювання клітинних реактивних форм кисню за допомогою DCFDA

Рівні реактивних форм кисню (РФК) після обробки tBHP були виміряні за допомогою 2', 7'-дихлорофлуоресциндацетату (DCFDA) – флуоресцентного індикатора РФК, що здатний проникати через мембрани, як було попередньо опи-

сано нами для нейронів (Burroughs та ін., 2012). АГЗН засіяні в 96-лункові планшети та були заповнені 10 мкМ DCFDA у повному живильному середовищі протягом 45 хв, після чого було індуковано оксидативний стрес, як описано в попередньому пункті. Клітини були двічі промиті 300 мкл розчином HBSS (збалансований сольовий розчин Хенка, Hank's balanced salt solution) з додаванням 2 мМ CaCl₂. Флуоресценцію DCFDA було виміряно в мультимодальному планшет-рідері (Synergy H1; Biotek, Winooski, VT) із такими настройками: довжина хвилі збудження $\lambda = 490$ нм, довжина хвилі емісії $\lambda = 525$ нм, 15 вимірів на лунку, автоматичне посилення. Флуоресценцію було обнулено та нормалізовано відповідно до умов носія (без обробки оксидативним стресом; 0 мкМ tBHP).

Методи вимірювання життєздатності клітин

Тест, заснований на поглинанні Кальцеїну-AM.

Тест, заснований на поглинанні Кальцеїну-AM, було здійснено, як описано раніше для первинної культури кортикальних нейронів [10]. Коротко, клітини в 96-лункових планшетах у живильному середовищі були заповнені барвником 5 мкМ Кальцеїн-AM (5 мМ стоку в диметилсульфоксиді (DMCO), Life Technologies, Carlsbad, CA) протягом 1 год при 37 °C/5 % CO₂/вологість 95 %. Після цього клітини було двічі промито в PBS. Показові зображення флуоресценції кальцеїну в АГЗН були зроблені за допомогою широкопольного мікроскопа DM-IL (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL), облаштованого метало-галідним джерелом світла CL2000 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) і камерою MicroPublisher (QImaging, Surrey, BC).

МТТтест. Вимірювання за допомогою МТТ (3-(4,5-диметил-2-тіазоліл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразолію броміду) були проведені, як це описано для С6 клітин астроглії, НТ-22 клітин і культури первинних кортикальних нейронів [9–11]. Коротко, середовище було аспіровано з клітин і замінено на 100 мкл 1,2 мМ МТТ у HBSS із кальцієм та магнієм (Lonza, Walkersville, MD) із додаванням буферного розчину 10 мМ 4-(2-гідроксиетил)піперазин-1-етансульфонової кислоти (HEPES), рН 7,3. Планшети було інкубовано при 37 °C протягом 2 год. Середовище було аспіровано, а клітини розщеплено в 100 мкл DMCO при легкому струшуванні. Перетворення МТТ було визначено вимірюванням абсорбції при 570 нм (A₅₇₀) за допомогою планшет-рідера SynergyH1 (Biotek).

Дані було експортовано в Microsoft Excel (Microsoft Corp.) для обробки та нормалізовано відносно колонки з даними без обробки МТТ і

tBHP. Після цього дані було нормалізовано відносно контрольних умов (0 мкМ tBHP з МТТ). Точки (одиначні лунки) зі значними відхиленнями були виключені з масиву даних для кожного подразника (колонка з 8 лунок на кожну концентрацію tBHP). У середньому на один 96-лунковий планшет було виключено 2 точки; максимальна кількість виключених точок на планшет становила 5 лунок. Припускаючи гауссовий розподіл даних, ми виключили будь-які точки за межами двох стандартних відхилень від середнього по колонці. Нормалізовані дані було згруповано відповідно до умов обробки й експортовано у програмне забезпечення Prism (GraphPad) для побудови графіків і статистичного аналізу. Нелінійна регресія з використанням 4-параметричного логістичного рівняння з варіабельним нахилом Хілла була проведена окремо для кожної біологічної репліки (96-лунковий планшет) для визначення IC₅₀ значень tBHP для кожного з попередньо оброблених варіантів умов (контроль, носій і Тролокс). Дані було проаналізовано з використанням двостороннього аналізу варіації (ANOVA) та пост-хок-тесту Бонфероні з умовами попередньої обробки (контроль, носій або Тролокс) і подразника (концентрація tBHP) як змінними. Статистичну значущість було визначено як $P < 0,05$.

Тест визначення смерті клітин, заснований на вимірюванні лактатдегідрогенази (ЛДГ). Ми оптимізували методику визначення лактатдегідрогенази (ЛДГ) для АГЗН, що було попередньо розроблено нами для гліопротекції клітин С6 астрогліоми [9]. Після 5 год інкубації з tBHP 50 мкл супернатанту культури клітин було перенесено в нестерильний, прозорий 96-лунковий планшет (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Після цього було додано тест-буфер для вимірювання, що містить 2 мМ йодонітротетразоліум хлориду, 3,2 мМ натрієвої солі β -нікотинамід-аденін-нуклеотиду, 160 мМ лактату натрію, 7,5 мкМ 1-метоксифеназін метосульфату в 0,2 М Тріс-НСІ, рН 8,2. Тест-буфер було підготовлено наперед зі стокових розчинів: буфер А (2X; 4 мМ йодонітротетразоліум хлориду в 0,2 М Тріс-НСІ, рН 8,2), буфер Б (2X; 6,4 мМ натрієвої солі β -нікотинамід-аденін-нуклеотиду, 320 мМ лактату натрію в 0,2 М Тріс-НСІ, рН 8,2) та 20000X МФМС у 0,2 М Тріс-НСІ, рН 8,2. Аліквоти розчинів зберігали за -20 °C для запобігання втраті активності. Тест-буфер було приготовлено безпосередньо перед додаванням до зразків супернатанту.

Планшети було інкубовано за кімнатної температури в темряві протягом 1 год. Реакцію зупинили додаванням 50 мкл 1 М оцтової кислоти.

Вивільнення ЛДГ оцінювали на основі вимірювання абсорбції при 490 нм (A_{490}) за допомогою планшет-рідера Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT). Дані експортували в Microsoft Excel (Microsoft Corp.) для обробки, де вони були нормалізовані відносно контролю (0 мкМ *t*VHP). Аналіз даних було виконано аналогічно до обробки, проведеної для описаного вище МТТ-тесту.

Результати

Вимірювання оксидативного стресу в культурі АГЗН за допомогою DCFDA показало, що після обробки *t*VHP рівні РФК досягли максимального підвищення в $4,97 \pm 0,33$ разу порівняно з контрольним значенням (рис. 1; $n = 4$ для кожної з умов) при регресії з використанням 4-параметричного нелінійного алгоритму. Статистично значиме підвищення рівнів РФК порівняно з

базальним рівнем було встановлено для концентрацій *t*VHP більше 100 мкМ, як було визначено за допомогою одностороннього ANOVA з постох-тестом Бонфероні (рис. 1, *a*). Напівмаксимальний ефект (EC_{50}) для *t*VHP на рівні РФК був встановлений апроксимацією точок для кожного індивідуального n , після чого було розраховано середнє значення для групи \pm стандартна похибка середнього (с.п.с.) ($192,1 \pm 15,7$ мкМ *t*VHP; $n = 4$; рис. 1, *a*).

На наступному етапі ми визначали життєздатність АГЗН за допомогою тестування, заснованого на поглинанні кальцеїну. Візуалізація АГЗН за допомогою мікроскопії показала зниження флуоресценції кальцеїну при обробці підвищеними концентраціями *t*VHP (рис. 1, *б*). Флуоресценцію було виміряно з використанням параметрів, описаних вище для DCFDA-тестування. Напівмаксимальний ефект (EC_{50}), який було визначено за до-

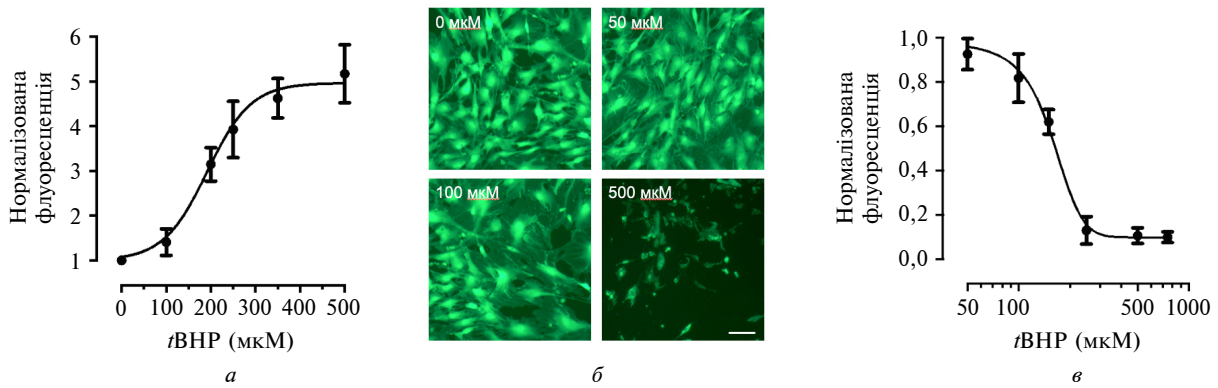


Рис. 1. (а) Генерація РФК була визначена за допомогою DCFDA-тесту. Обробка *t*VHP привела до максимального підвищення генерації у 5,1 разу порівняно з контрольними умовами. Дані наведено як середнє значення \pm с.п.с. ($n = 5$). (б) Показові зображення АГЗН, забарвлених кальцеїном. Підвищення дози *t*VHP знижує флуоресценцію кальцеїну. Масштаб: 25 мкм. (в) Флуоресценцію кальцеїну було виміряно за допомогою H1 планшет-рідера (Biotek) і кінцеві нормалізовані дані було апроксимовано за допомогою 4-параметричної асиметричної нелінійної регресійної моделі. Дані наведено як середнє значення \pm с.п.с. ($n = 3$)

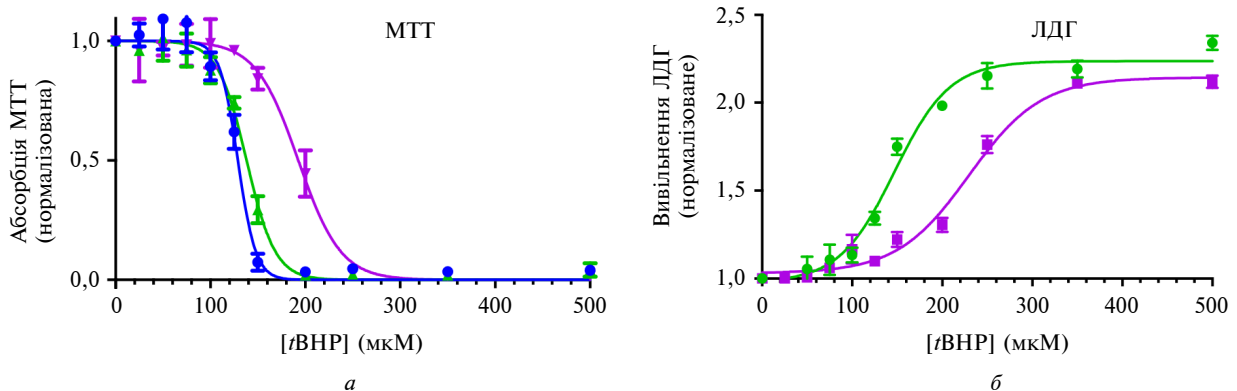


Рис. 2. (а) Крива доза–ефект для *t*VHP у МТТ-аналізі. Застосування Тролоксу зміщує напівмаксимальний ефект (EC_{50}) для *t*VHP приблизно на 60 мкМ: \blacktriangle – контроль; \bullet – етанол; \blacktriangledown – Тролокс. (б) Схожі результати були отримані після вимірювання вивільнення ЛДГ у нашому оригінальному тесті. Наш тест із високою достовірністю показав зростання вивільнення клітинної ЛДГ у 2,2 разу у відповідь на обробку *t*VHP. Обробка Тролоксом (100 мкМ) значно змістила напівмаксимальні (EC_{50}) значення для *t*VHP. Дані наведено як середнє значення \pm с.п.с. з різних планшетів ($n = 5$) та проаналізовано з використанням ANOVA ($P < 0,001$): \bullet – контроль; \blacktriangledown – Тролокс

помогою апроксимації кожного індивідуального набору даних, становив $156,9 \pm 3,8$ мкМ *t*ВНР ($n = 3$; рис. 1, *в*).

У наступному ряді експериментів ми визначали реакцію АГЗН на оксидативний стрес вимірюванням життєздатності клітин у МТТ-тесті й тесті на вивільнення ЛДГ. У МТТ-тесті EC_{50} для *t*ВНР становила $138,1 \pm 1,4$ мкМ ($n = 3$; рис. 2, *а*) та зазнала статистично незначних змін при обробці носієм з 0,1 % етанолу ($128,9 \pm 1,6$ мкМ; $n = 3$; рис. 2, *а*). При попередній обробці клітин Тролоксом (100 мкМ) ми спостерігали значне зміщення кривої вправо зі значенням EC_{50} $192,7 \pm 2,8$ мкМ ($n = 3$; $P < 0,001$; рис. 2, *а*).

Максимальне значення рівнів ЛДГ після обробки *t*ВНР було в 2,2 разу більше порівняно з контролем. Значення EC_{50} становили $146,9 \pm 4,9$ і $246,3 \pm 7,3$ мкМ для контрольних умов та для умов із попередньою обробкою Тролоксом відповідно ($n = 3$; ANOVA $P < 0,001$; рис. 2, *б*). Носій (0,1 %-ний етанол) не мав статистично значущого впливу на вивільнення ЛДГ (дані не показано).

Обговорення

Існує велика кількість тестів для визначення життєздатності клітин, які можуть бути використані у загальних дослідженнях гліо- або цитопротекції. Вони включають тести, наведені у нашій роботі, що засновані на функціонуванні внутрішньоклітинних ферментів, а також на застосуванні таких вітальних барвників, як трипановий синій та нейтральний червоний [12–16]. Використання таких вітальних барвників, як трипан синій, дає можливість легкої візуалізації, тоді як ферментні тести характеризуються низькою варіабельністю, високою точністю та легкістю в автоматизації [14]. Крім того, різні тести характеризуються селективною чутливістю до різних впливів і кріопротекторів залежно від механізму їх дії [12, 13, 15, 16]. Наприклад, ЛДГ-тест може давати неточні результати, якщо зовнішній чинник впливає тільки на внутрішньоклітинні шляхи без впливу на

цілісність мембрани [12]. Таким чином, придатність тестів повинна індивідуально визначатися для кожного зовнішнього чинника та цитопротектора. У нашій роботі було показано, що для первинної культури АГЗН, що зазнала впливу *t*ВНР, тести поглинання кальцеїну-АМ, а також ЛДГ- і МТТ-тести дали схожі результати, показавши значення з низькою варіабельністю в експериментах з дослідження клітинної смерті під впливом оксидативного стресу та за умов цитопротекції Тролоксом.

Висновки

У результаті проведеного дослідження продемонстровано низку протоколів, що описують використання первинної культури АГЗН щура як моделі для гліопротекції. У роботі продемонстровано, що для первинної культури АГЗН, яка зазнала впливу *t*ВНР, тести поглинання кальцеїну-АМ, а також ЛДГ- та МТТ-тести дали схожі результати, показавши значення з низькою варіабельністю в експериментах дослідження клітинної смерті під впливом оксидативного стресу та за умов цитопротекції Тролоксом. Показана можливість використання первинної культури АГЗН щура в тестах із використанням планшет-рідера в експериментах пошуку нових лікарських засобів для лікування глаукоми та розладів ЗН і його головки.

Отримані результати можуть бути використані для видозміни цих оригінальних стандартизованих протоколів у високопродуктивні та багатопараметричні платформи.

Особлива подяка за підтримку

Фонд підтримки професорської діяльності у офтальмології імені др. Джона П. та Тересе І. Малкехі (Dr. John P. and Therese E. Mulcahy Professorship in Ophthalmology).

Список літератури

1. Quigley H.A. Glaucoma // *Lancet*. – 2011. – 377, № 9774. – P. 1367–1377.
2. Primary open-angle glaucoma / R.N. Weinreb, C.K.S. Leung, J.G. Crowston et al. // *Nat. Rev. Dis. Primers*. – 2016. – 2. – P. 16067.
3. Weinreb R.N., Aung T., Medeiros F.A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review // *JAMA*. – 2014. – 311, № 18. – P. 1901–1911.
4. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina / A.J. Payne, S. Kaja, Y. Naumchuk et al. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2014. – 15, № 2. – P. 1865–1886.
5. Chang E.E., Goldberg J.L. Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement // *Ophthalmology*. – 2012. – 119, № 5. – P. 979–986.

6. Hernandez M.R. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2000. – **19**, № 3. – P. 297–321.
7. Hernandez M.R., Miao H., Lukas T. Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy // *Prog. Brain Res.* – 2008. – **173**. – P. 353–373.
8. Differential subcellular Ca(2+) signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes / S. Kaja, A.J. Payne, K.R. Patel et al. // *Experimental Neurology*. – 2015. – **265**. – P. 59–68.
9. An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience / S. Kaja, A.J. Payne, T. Singh et al. // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2015. – **73**. – P. 1–6.
10. Plate reader-based assays for measuring cell viability, neuroprotection and calcium in primary neuronal cultures / S. Burroughs, R.S. Duncan, P. Rayudu et al. // *J. Neurosci. Methods*. – 2012. – **203**, № 1. – P. 141–145.
11. Novel mechanism of increased Ca²⁺ release following oxidative stress in neuronal cells involves type 2 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors / S. Kaja, R.S. Duncan, S. Longoria et al. // *Neuroscience*. – 2011. – **175**. – P. 281–291.
12. Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays // *Int. J. Pharm.* – 2005. – **288**, № 2. – P. 369–376.
13. Fotakis G., Timbrell J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride // *Toxicol. Lett.* – 2006. – **160**, № 2. – P. 171–177.
14. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures / H.O. Jauregui, N.T. Hayner, J.L. Driscoll et al. // *In Vitro*. – 1981. – **17**, № 12. – P. 1100–1110.
15. Chiba K., Kawakami K., Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells // *Toxicol. In Vitro*. – 1998. – **12**, № 3. – P. 251–258.
16. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? // *J. Neurosci. Methods*. – 2000. – **96**, № 2. – P. 147–152.

References

- [1] H.A. Quigley, “Glaucoma”, *Lancet*, vol. 377, no. 9774, pp. 1367–1377, 2011. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61423-7
- [2] R.N. Weinreb et al., “Primary open-angle glaucoma”, *Nat. Rev. Dis. Primers*, vol. 2, pp. 16067, 2016. doi: 10.1038/nrdp.2016.67
- [3] R.N. Weinreb et al., “The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review”, *JAMA*, vol. 311, no. 18, pp. 1901–1911, 2014. doi: 10.1001/jama.2014.3192
- [4] A.J. Payne et al., “Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 1865–1886, 2014. doi: 10.3390/ijms15021865
- [5] E.E. Chang and J.L. Goldberg, “Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement”, *Ophthalmology*, vol. 119, no. 5, pp. 979–986, 2012. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.11.003
- [6] M.R. Hernandez, “The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling”, *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 297–321, 2000. doi: 10.1016/S1350-9462(99)00017-8
- [7] M.R. Hernandez et al., “Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy”, *Prog. Brain Res.*, vol. 173, pp. 353–373, 2008. doi: 10.1016/S0079-6123(08)01125-4.
- [8] S. Kaja et al., “Differential subcellular Ca(2+) signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes”, *Experimental Neurology*, vol. 265, pp. 59–68, 2015. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.12.014
- [9] S. Kaja et al., “An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience”, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 73, pp. 1–6, 2015. doi: 10.1016/j.vascn.2015.02.001
- [10] S. Burroughs et al., “Plate reader-based assays for measuring cell viability, neuroprotection and calcium in primary neuronal cultures”, *J. Neurosci. Methods*, vol. 203, no. 1, pp. 141–145, 2012. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.007
- [11] S. Kaja et al., “Novel mechanism of increased Ca²⁺ release following oxidative stress in neuronal cells involves type 2 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors”, *Neuroscience*, vol. 175, pp. 281–291, 2011. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.010
- [12] J. Weyermann et al., “A practical note on the use of cytotoxicity assays”, *Int. J. Pharm.*, vol. 288, no. 2, pp. 369–76, 2005. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.09.018
- [13] G. Fotakis and J.A. Timbrell, “*In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride”, *Toxicol. Lett.*, vol. 160, no. 2, pp. 171–177, 2006. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- [14] H.O. Jauregui et al., “Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures”, *In Vitro*, vol. 17, no. 12, pp. 1100–1110, 1981. doi: 10.1007/BF02618612
- [15] K. Chiba et al., “Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells”, *Toxicol. In Vitro*, vol. 12, no. 3, pp. 251–258, 1998. doi: 10.1016/S0887-2333(97)00107-0
- [16] D. Lobner, “Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?”, *J. Neurosci. Methods*, vol. 96, no. 2, pp. 147–152, 2000. doi: 10.1016/S0165-0270(99)00193-4

Ю.А. Наумчук, В.Б. Максименко, С. Кая

ОПТИМИЗАЦІЯ ТЕСТІВ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ДЛЯ СКРИНІНГУ ГЛІОПРОТЕКТОРНИХ СПОЛУК У КУЛЬТУРІ ПЕРВИННИХ АСТРОЦИТІВ ГОЛОВКИ ЗОРОВОГО НЕРВУ ЩУРА

Проблематика. Астроцити головки зорового нерву (АГЗН) є основним типом гліальних клітин у немієлінованій головці зорового нерву, де вони беруть участь у синтезі зовнішньоклітинного матриксу. Патологічні зміни при глаукомі включають реактивний астроцитоз – процес, що характеризується змінами в експресії астроцитарних генів і білків, а також ремоделінгом зовнішньоклітинного матриксу. АГЗН є надзвичайно чутливими до механічного та оксидативного стресу, що призводить до ініціації ушкодження аксонів при ранньому патогенезі. Крім того, АГЗН відіграють ключову роль у підтримці фізіології та функцій гангліонарних клітин сітківки. Саме тому гліопротекторні стратегії з метою збереження і/або відновлення структурної та функціональної життєздатності АГЗН для сповільнення глаукоми та споріднених патологій є надзвичайно важливими для клінічної практики.

Мета дослідження. Розробка стандартизованих методів для систематичного впровадження гліопротекторних стратегій із використанням тестів з визначення життєздатності, проліферації та внутрішньоклітинного редокс-стану клітин за допомогою планшет-ридера.

Методика реалізації. У нашій роботі ми використовували первинну культуру АГЗН як модельну систему. Оксидативний стрес було індуковано за допомогою tBHP. Реактивні форми кисню (РФК) було виміряно за допомогою тесту DCFDA. Для тестів життєздатності клітин ми використовували оптимізований нами тест вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ), а також тест МТТ і тест поглинання Кальцеїну-АМ.

Результати дослідження. Напівмаксимальний ефект (EC_{50}) tBHP для рівнів РФК у АГЗН у тесті DCFDA становив $192,1 \pm 15,7$ мкМ. Вимірювання клітинної життєздатності АГЗН після оксидативного стресу, індукованого tBHP, показало $EC_{50} = 156,9 \pm 3,8$ мкМ у тесті поглинання Кальцеїну-АМ. У тесті МТТ EC_{50} для tBHP становило $138,1 \pm 1,4$ мкМ і змістилося до $192,7 \pm 2,8$ мкМ після попередньої обробки АГЗН 100 мкМ Тролоксом. У тесті вивільнення ЛДГ EC_{50} для tBHP становило $146,9 \pm 4,9$ і $246,3 \pm 7,3$ мкМ для контрольного та обробленого Тролоксом зразків відповідно.

Висновки. Наші результати надають данні про можливість проводити скринінг новітніх гліопротекторів з допомогою планшет-ридера, використовуючи первинну культуру АГЗН.

Ключові слова: глаукома; астроцити головки зорового нерву; оксидативний стрес; реактивні форми кисню; тести на визначення життєздатності клітин.

Ю.А. Наумчук, В.Б. Максименко, С. Кая

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕСТОВ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ДЛЯ СКРИНИНГА ГЛИОПРОТЕКТОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ПЕРВИЧНЫХ АСТРОЦИТОВ ГОЛОВКИ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА КРЫСЫ

Проблематика. Астроциты головки зрительного нерва (АГЗН) являются основным типом глияльных клеток в немиелинированной головке зрительного нерва, где они участвуют в синтезе внешнечелочного матрикса. Патологические изменения при глаукоме включают реактивный астроцитоз – процесс, который характеризуется изменениями в экспрессии астроцитарных генов и белков, а также ремоделлингом внешнечелочного матрикса. АГЗН являются чрезвычайно чувствительными к механическому и оксидативному стрессу, что приводит к инициации повреждения аксонов при раннем патогенезе. Кроме того, АГЗН играют ключевую роль в поддержке физиологии и функций ганглионарных клеток сетчатки. Именно поэтому глиопротекторные стратегии с целью сохранения и/или возобновления структурной и функциональной жизнеспособности АГЗН для замедления глаукомы и сродных патологий являются чрезвычайно важными для клинической практики.

Цель исследования. Разработка стандартизированных методов для систематического внедрения глиопротекторных стратегий с использованием тестов определения жизнеспособности, пролиферации и внутриклеточного редокс-состояния клеток с помощью планшетного ридера.

Методика реализации. В нашей работе мы использовали первичную культуру АГЗН как модельную систему. Оксидативный стресс был индуцирован с помощью tBHP. Реактивные формы кислорода (РФК) были измерены с помощью теста DCFDA. Для тестов жизнеспособности клеток мы использовали оптимизированный нами тест высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также тест МТТ и тест поглощения Кальцеина-АМ.

Результаты исследования. Полумаксимальный эффект (EC_{50}) tBHP для уровней РФК в АГЗН в тесте DCFDA составил $192,1 \pm 15,7$ мкМ. Измерение клеточной жизнеспособности АГЗН после оксидативного стресса, индуцированного tBHP, показало $EC_{50} = 156,9 \pm 3,8$ мкМ в тесте поглощения Кальцеина-АМ. В тесте МТТ EC_{50} для tBHP составило $138,1 \pm 1,4$ мкМ и сместилось до $192,7 \pm 2,8$ мкМ после предварительной обработки АГЗН 100 мкМ Тролоксом. В тесте высвобождения ЛДГ EC_{50} для tBHP составило $146,9 \pm 4,9$ и $246,3 \pm 7,3$ мкМ для контрольного и обработанного Тролоксом образцов соответственно.

Выводы. Наши результаты предоставляют данные о возможности проводить скрининг новейших глиопротекторов с помощью планшетного ридера, используя первичную культуру АГЗН.

Ключевые слова: глаукома; астроциты головки зрительного нерва; оксидативный стресс; реактивные формы кислорода; тесты на определение жизнеспособности клеток.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Надійшла до редакції
11 листопада 2017 року