

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ α_2 -АДРЕНОМИМЕТИКОВ

Готкович Д.А., Гутник В.В., Чепелев С.Н., Досина М.О.*

Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра патологической физиологии

*ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», г. Минск

Ключевые слова: клонидин, опухоль, клетки глиомы С6, пролиферативная активность, жизнеспособность, α_2 -адреномиметики.

Резюме: онкологические заболевания занимают второе место в структуре причин смертности жителей Республики Беларусь. Большое значение имеет разработка и внедрение новых методов лечения онкологических заболеваний. В настоящей работе представлено исследование противоопухолевой активности альфа 2 -адреномиметиков на примере клонидна.

Resume: oncological diseases takes second place in mortality causes among the Republic of Belarus residents. Importance leader in this sphere - new ways of cancer treatment. In this article you can find research of the antitumor activity of alpha 2 -adreonomimetrics using clonidine as an example.

Актуальность. Согласно официальной статистической отчетности онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности населения Республики Беларусь. Число умерших от онкологии в 2017 году составило 194,3 на 100000 населения (рисунок 1) [6].

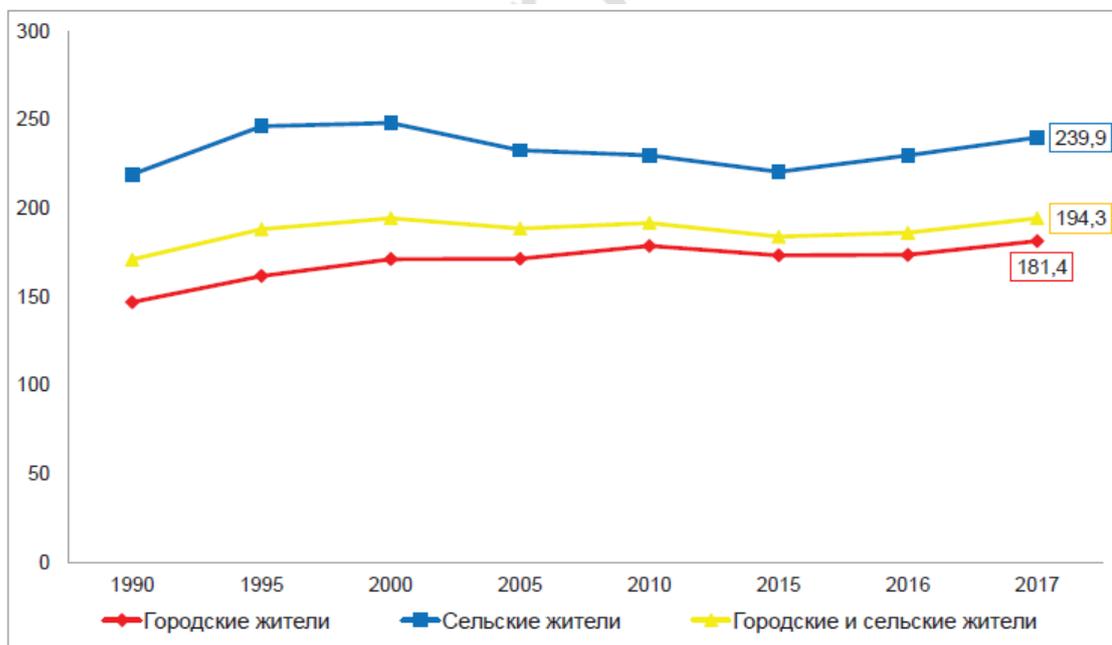


Рис. 1 – Смертность населения Республики Беларусь от злокачественных новообразований (на 100 тыс. населения) в 2017 г.

Среди множества новообразований весьма актуальными являются новообразования центральной нервной системы [1, 4, 5]. Глиомы являются злокачественными формами опухолей головного мозга и составляют около 30% всех новообразований [2]. Глиома является одним из самых опасных новообразований

из-за плохой реакции на лечение, высокой частоты рецидивов и низких показателей продолжительности жизни [3, 8, 10].

Доказано, что на мембранах нейронов ряда опухолевых новообразований (в том числе глиальных) располагаются альфа-2 адренорецепторы. Агонистом данного типа рецепторов является широко известный препарат клонидин [7, 9].

В связи с этим представляет интерес уточнение вопроса о реакции клеток глиальных опухолей при контакте их мембраны с раствором, содержащим разные концентрации клонидина.

Цель: изучить влияние клонидина на процессы пролиферации и жизнедеятельность клеток крысиной глиомы линии С6.

Задачи: 1. Изучить пролиферативную активность клеток крысиной глиомы линии С6 при аппликации клонидином; 2. Выяснить жизнеспособность клеток крысиной глиомы линии С6 при аппликации клонидином.

Материал и методы. Исследование было проведено на базе лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Для исследования использовалась перевиваемая культура клеток крысиной глиомы С6, полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) (рисунок 2).

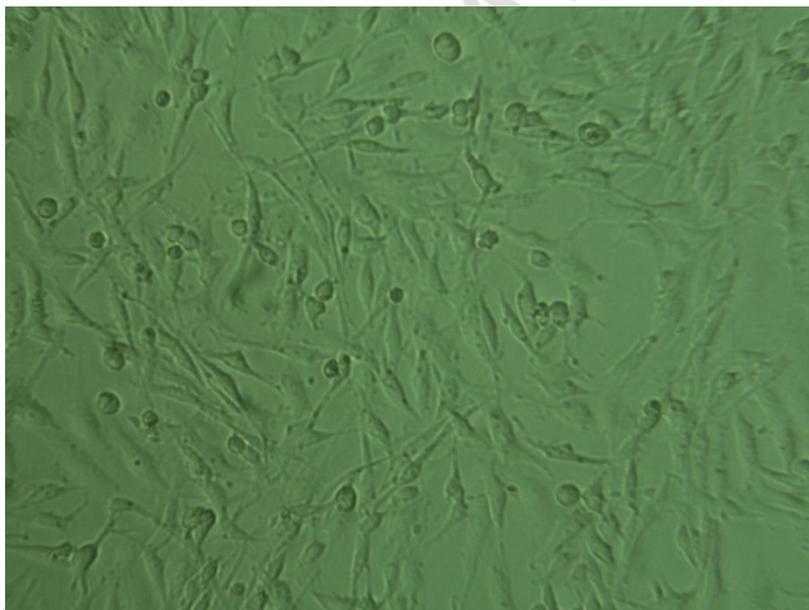


Рис. 2 – Микроскопическое изображение интактных клеток глиомы С6 крысы

Клетки глиомы культивировали (концентрация $2,0 \times 10^5$ клеток/мл) в чашках Петри с диаметром основания 30 мм в среде F10 (среда с глутамином, пируватом натрия, глюкозой, без NERES). В среду добавляли 10%-ную эмбриональную бычью сыворотку и раствора гентамицина сульфата в концентрации 10^{-4} мг/мл [6].

Чашки Петри помещали в CO_2 -инкубатор (ShellLab Series 3517, США) при 5% CO_2 и температуре $37^\circ C$. Через 24 часа после начала культивирования клеток добавляли в центральную часть чашки Петри клонидин в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл.

Для сравнения результатов использовали 4 чашки Петри:

- 1 чашка – интактная культура клеток (контроль);

- 2 чашка – аппликация в центральную часть чашки Петри клонидина в концентрации 100 мкг/мл;
- 3 чашка - аппликация в центральную часть чашки Петри клонидина в концентрации 10 мкг/мл;
- 4 чашка - аппликация в центральную часть чашки Петри клонидина в концентрации 1 мкг/мл.

Жизнеспособность клеток глиомы С6 после аппликации клонидина оценивалась на микроскопе Opton ISM-405 (Германия) путем подсчёта количества клеток. Для этого культуру клеток предварительно окрашивали трипановым синим, при этом жизнеспособные клетки не окрашивались.

Изменение пролиферативной активности клеток оценивалась путем анализа прироста клеточной массы. Для этого до начала эксперимента осуществляли фотографирование в месте метки трех случайно выбранных полей. Через 24 часа после аппликации клонидина осуществляли также фотографирование трех случайно выбранных полей.

Результаты и их обсуждение. При аппликации раствора клонидина в концентрации 100 мкг/мл пролиферативная активность опухолевых клеток значительно снизилась ($p < 0,05$) (в интактной группе прирост клеточной массы составил $458,67 \pm 49,10$ клеток, в группе 100 мкг/кг – $305,67 \pm 32,17$ клеток). А при добавлении раствора клонидина в концентрациях 1 и 10 мкг/мл пролиферативная активность не изменилась значительно (в группе 1 мкг/кг прирост клеточной массы составил $425,33 \pm 21,36$ клеток, в группе 10 мкг/кг – $476,33 \pm 43,80$ клеток). Таким образом, можно заключить, что влияние клонидина на пролиферативную активность клеток имеет дозозависимый эффект (рисунок 3).

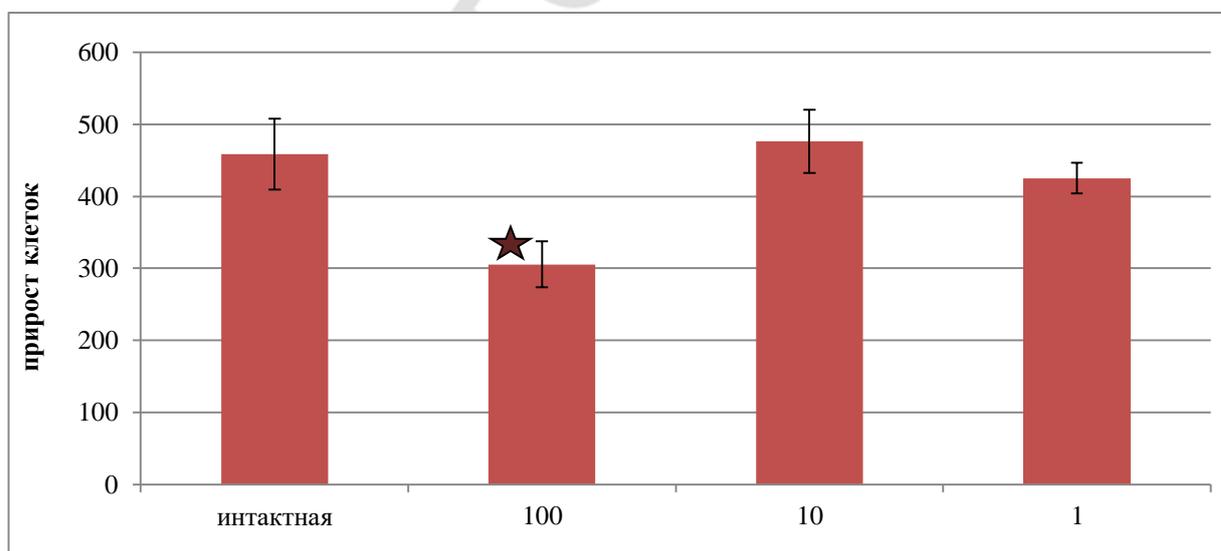


Рис. 3 – Изменение пролиферативной активности клеток после аппликации клонидина в различных концентрациях (мкг/мл)

Примечание: ★ – $p < 0,05$ – различия статистически значимы

Аналогичная тенденция выявлена и при оценке жизнеспособности после аппликации раствора клонидина в различных концентрациях. Так установлено, что внесение раствора клонидина в культуральную среду в концентрации 100 мкг/мл

значительно снижает жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с интактными клетками ($p < 0,05$) (в интактной группе жизнеспособность составила $93,63 \pm 0,89\%$, в группе 100 мкг/кг – $86,63 \pm 0,61\%$). А при добавлении раствора клонидина в концентрациях 1 и 10 мкг/мл жизнеспособность практически не изменилась (в группе 1 мкг/кг жизнеспособность составила $93,18 \pm 1,64\%$, в группе 10 мкг/кг – $95,42 \pm 0,98\%$) (рисунок 4).

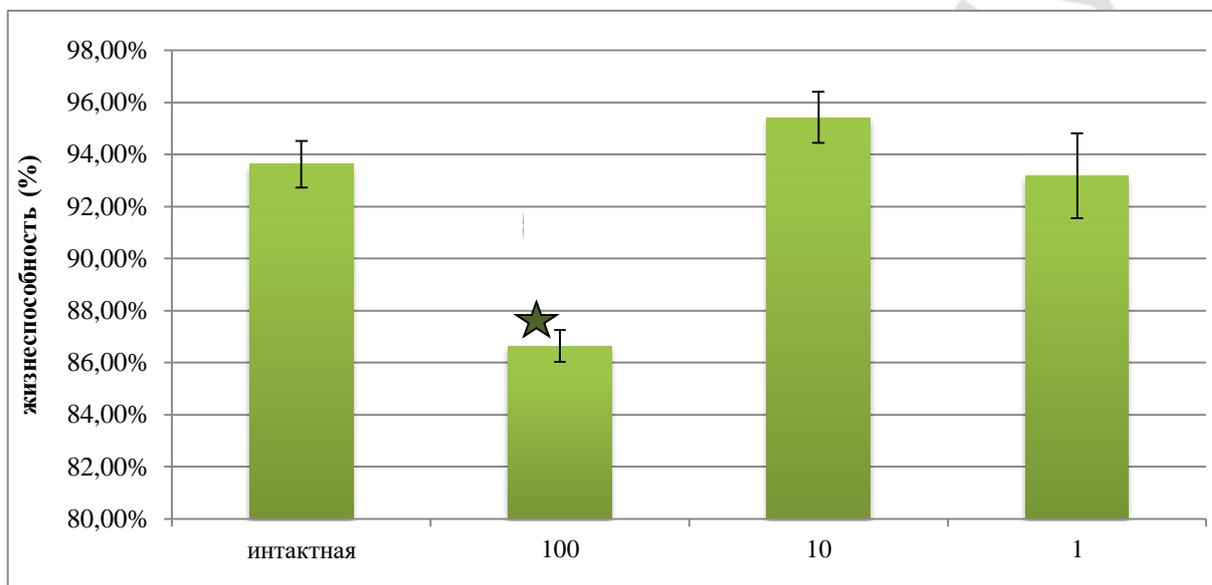


Рис. 4 – Изменение жизнеспособности клеток после аппликации клонидина в различных концентрациях (мкг/мл)

Примечание: ★ – $p < 0,05$ – различия статистически значимы

Таким образом, выявлены новые фармакологические эффекты клонидина, которые определяют его потенциальную эффективность в терапии глиальных опухолей и требуют дальнейшего изучения.

Выводы: 1. установлено, что раствор клонидина в концентрации 100 мкг/мл достоверно снижает пролиферативную активность клеток крысиной глиомы линии С6; 2. Выявлено, что раствор клонидина в концентрации 100 мкг/мл эффективен в целях снижения пролиферативной активности клеток крысиной глиомы линии С6; 3. Целесообразно продолжить изучение фармакологического действия клонидина на опухолевые клетки с целью возможного использования в терапии злокачественных новообразований.

Литература

1. Буравлев, В.М. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы, техника, проблемы / В. М. Буравлев [и др.]; отв. ред. Б. Н. Вепринцев. – М.: Наука, 1976. – 352 с.
2. Висмонт, Ф. И. Общая патофизиология: учеб. пособие / Ф. И. Висмонт, Е.В. Леонова, А. В. Чантурия. – Минск : Вышэйшая школа., 2011. – 364 с.
3. Гольш, Н.Н. Опухоли головного мозга и нарушения мозгового кровообращения / Н.Н. Гольш, З.П. Крушинская // Современные проблемы нейрохирургии. - Л., 1977. – С. 19.
4. Готкович, Д. А. Жизнеспособность и пролиферативная активность клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином / Д. А. Готкович, В. В. Гутник // Аспирантские чтения – 2019: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые: научные исследования и инновации» / Под редакцией профессора РАН А.В.

Колсанова и академика РАН профессора Г.П. Котельникова. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2018. – С. 330-333.

5. Гутник, В. В. Жизнеспособность клеток глиомы С6 крыс при аппликации клонидином / В. В. Гутник, Д. А. Готкович, С. Н. Чепелев // Актуальные вопросы медицинской науки: 3-ей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященная 75-летию Ярославского государственного медицинского университета. — Ярославль, издательство «Аверс ПЛЮС», 2019, – С. 72.

6. Здравоохранение в Республике Беларусь [Электронное издание]: офиц. стат. сб. за 2017 г. — Минск : ГУ РНМБ, 2018. – 274 с.

7. Киселева, Е. В. Определение границы инфильтративно растущей опухоли на модели глиомы крысы методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии: пилотное исследование / Е. В. Киселева и др. // Современные технологии в медицине. – 2018. – № 1. – С. 6-14.

8. Токальчик, Д. П. Эффекты клофелина при аппликации на слизистую оболочку полости носа наркотизированных крыс / Д. П. Токальчик, Ж. А. Гладкова // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2015. – № 2. – С. 86-88.

9. Jovčevska I. Glioma and glioblastoma how much do we (not) know? / I. Jovčevska, N. Kočevar, R. Komel // Molec. and Clin. Oncology. – 2013. – Vol. 1, № 6. – P. 935–941.

10. Watkins, S. Disruption of astrocytevascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells / S. Watkins // Nature Commun. – 2014. – Vol. 5. – P. 4196.