

В. В. Гутник, Д. А. Готкович

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КЛОНИДИНА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ПЕРЕВИВАЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ
ГЛИОМЫ КРЫСЫ C6 IN VITRO**

*Научные руководители: ст. преп. С. Н. Чепелев, канд. биол. наук М. О. Досина**

Кафедра патологической физиологии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

**Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск*

V. V. Gutnik, D. A. Gotkovich

**STUDY OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF CLONIDIN IN AN EXPERIMENT
ON THE TRANSFERRED CELL CULTURE OF RAT C6 GLIOMA IN VITRO**

Tutors: Senior Lecturer S. N. Chepelev,

*PhD in Biology M. O. Dosina**

Department of Pathological Physiology,

Belarusian State Medical University, Minsk

**Institute of Physiology, NAS of Belarus, Minsk*

Резюме. Работа посвящена изучению жизнеспособности и пролиферативной активности клеток глиомы C6 крысы при аппликации клонидином. В ходе исследования было установлено, что раствор клонидина в концентрации 100 мкг/мл эффективен в целях замедления роста и развития клеток глиомы C6 крысы, в то же время раствора клонидина в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл не влияет на пролиферативную активность и жизнеспособность клеток глиомы C6 крысы.

Ключевые слова: клонидин, клетки глиомы C6, пролиферативная активность, жизнеспособность, эффективная концентрация, крысы.

Resume. The work is devoted to the study of the viability and proliferative activity of rat C6 glioma cells when applied with clonidine. The study found that a solution of clonidine at a concentration of 100 µg/ml is effective in slowing down the growth and development of rat C6 glioma cells, while at the same time a solution of clonidine at concentrations of 1 µg/ml and 10 µg/ml does not affect the proliferative activity and viability of rat C6 glioma cells.

Keywords: clonidine, C6 glioma cells, proliferation activity, viability, effective concentration, rats.

Актуальность. Злокачественные новообразования являются одной из наиболее сложных медико-социальных проблем современного общества [1]. Разрешение проблем онкологии является важнейшей задачей медицинской науки. Рак является второй из основных причин смерти в мире, практически каждая шестая смерть в мире случается от рака, так, в 2018 г. от данного заболевания умерли 9,6 млн человек [9]. Глиома является опухолью, входящей в гетерогенную группу и имеющую нейроэктодермальное происхождение. Глиомы являются злокачественными формами опухолей головного мозга и составляют около 30% всех новообразований. Средняя продолжительность жизни у пациентов с момента постановки диагноза составляет приблизительно 15 месяцев, менее 5% пациентов живут дольше 5 лет из-за 80% рецидива агрессивной глиомы [3, 7]. Плохая реакция на лечение, высокая частота рецидивов и низкие показатели продолжительности жизни делают глиому одним из наиболее опасных новообразований. Глиома быстро

распространяется и может колонизировать весь мозг, так как опухолевые инвазивные клетки довольно быстро распространяются далеко за пределами основной массы опухоли. Образование глиомы характеризуется высокой плотностью микрососудов, в которых выявляется масса дефектов, аномальная морфология и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера [4]. В последнее десятилетие становится очевидным, что связанная со стрессом активация симпатoadренальной нервной системы играет важную роль в развитии опухолей, а также в регуляции микрососудов головного мозга [5]. Клинические исследования показывают, что глиома часто ассоциируется с высоким уровнем катехоламинов, в особенности адреналина, а блокада бета2-адренорецепторов (Б2-АР) улучшает результаты лечения больных данным раком [8]. Вовлечение Б2-АР и бета-аррестина-1 как ко-фактора сигнальной трансмембранной передачи нервного импульса в развитие различных форм онкологии показано во многих исследованиях [8, 10]. Однако роль альфа2-адренорецепторов (А2-АР) в механизмах, ответственных за прогрессирование (пролиферацию и жизнеспособность) глиом, остается недостаточно изученным [2, 4]. Так, актуальным в настоящее время представляется уточнение вопроса о поведении клеток глиальных опухолей при контакте их мембраны с раствором, содержащим разные концентрации клонидина (препарата агониста А2-АР), поскольку доказано, что рецепторы, чувствительные к клонидину, содержатся на мембране некоторых опухолей головного мозга [3, 4]. Клонидин является широко распространенным и популярным средством, используемым в качестве обезболивающего препарата для пациентов со злокачественной симптоматической гипертензией для уменьшения внутричерепного давления [6].

Цель: изучить жизнеспособность и пролиферативную активность клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл.

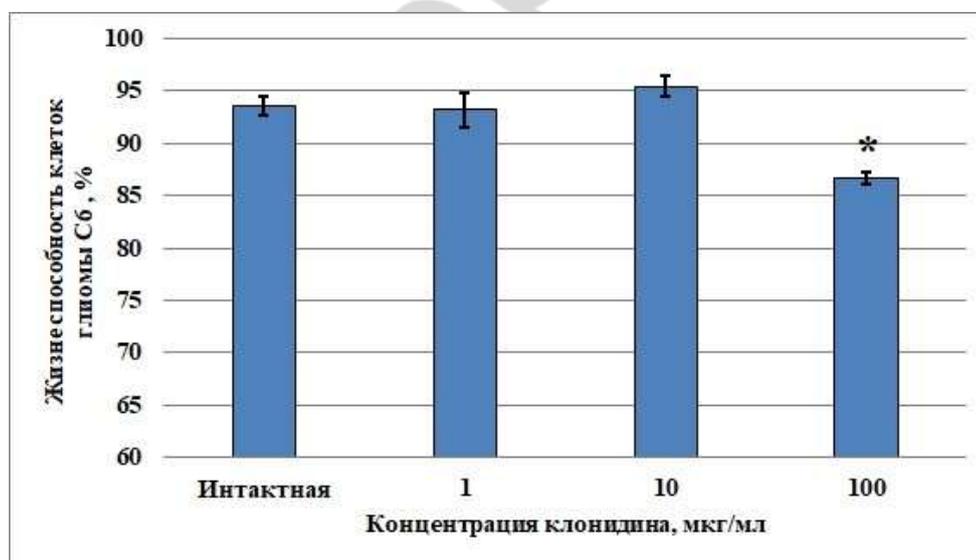
Задачи:

1. Изучить жизнеспособность клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл.
2. Оценить пролиферативную активность клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл.

Материалы и методы. Исследование проведено на базе лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Института физиологии НАН Беларуси» (Республика Беларусь, г. Минск) на перевиваемой культуре клеток глиомы С6 крысы, полученной из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали (концентрация $2,0 \times 10^5$ клеток/мл) в чашках Петри с диаметром основания 30 мм в среде F10 с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки и 0,1 мкг/мл раствора сульфата гентамицина. Чашки Петри размещали в CO₂-инкубаторе (ShellLab Series 3517, США) при 5% CO₂ и температуре 37°C. Через 24 часа после начала культивирования клеток глиомы С6 добавляли в центральную часть чашки Петри клонидин в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл. Для сравнения результатов использовали интактную культуру клеток глиомы С6. Оценку жизнеспособности культивируемых клеток осуществляли с помощью подсчета количества клеток на микроскопе Opton ISM-405 (Германия) при 16-кратном увеличении после

предварительной окраски трипановым синим. Жизнеспособные клетки при этом не окрашивались. Жизнеспособность определялась по формуле: (количество живых клеток/общее количество клеток)*100%. Визуализацию и фотографирование осуществляли с помощью инвертированного микроскопа NY-2E (Zeiss Inc., Германия) и цифровой камеры Altra 20 (OLYMPUS, Япония). Обработку фотографий проводили с использованием программного обеспечения Image G. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки статистических различий между независимыми выборками применялся U-критерий Манна Уитни. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Изменение пролиферативной активности клеток проводили путем анализа прироста клеточной массы. Для этого до начала и через 24 часа после начала эксперимента осуществлялось фотографирование в месте метки трех случайно выбранных полей, после чего оценивалась разница в изменении клеточной массы. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки достоверности различий между двумя выборками независимых измерений применялся непараметрический статистический тест T-критерий Вилкоксона. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение. При анализе жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 были получены следующие данные: в интактной группе жизнеспособность составила $93,63 \pm 0,89\%$, в группе 1 мкг/мл – $93,18 \pm 1,64\%$, в группе 10 мкг/мл – $95,42 \pm 0,98\%$, в группе 100 мкг/мл – $86,63 \pm 0,61\%$ ($p < 0,05$ по сравнению с интактной группой) (рисунок 1).



* – $p < 0,05$ – различия статистически значимы

Рис. 1 – Изменение жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл

Микроскопически изменения жизнеспособности клеток глиомы крысы С6 в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл представлены на рисунке 2.

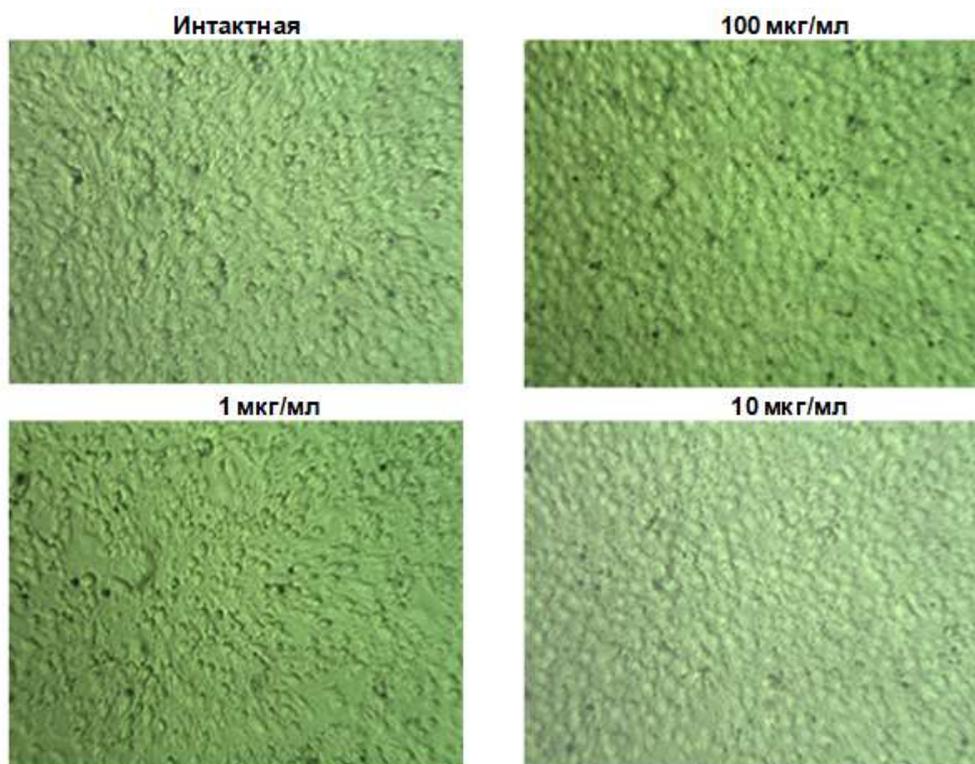
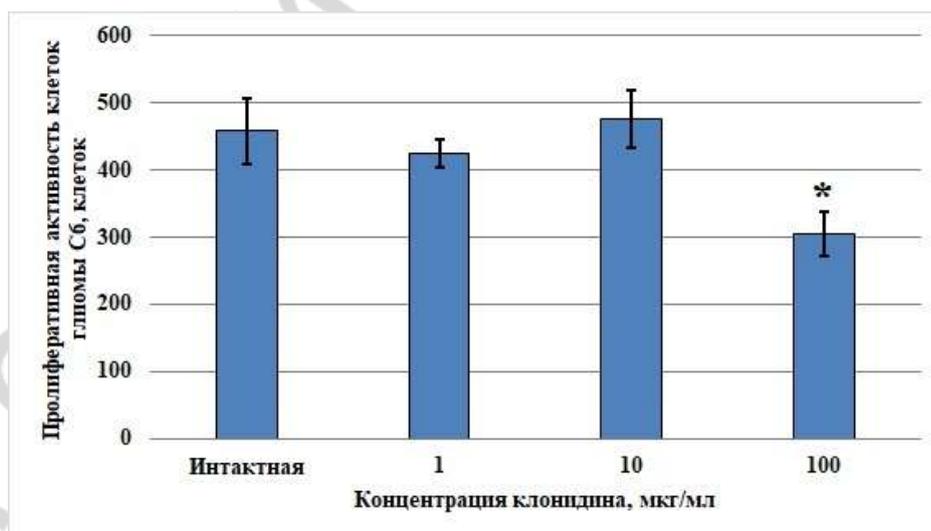


Рис. 2 – Микроскопические изменения жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл (окраска трипановым синим, 16-кратное увеличение)

При изучении пролиферативной активности культивируемых клеток глиомы С6 были получены следующие данные: в интактной группе прирост клеточной массы составил $458,67 \pm 49,10$ клеток, в группе 1 мкг/мл – $425,33 \pm 21,36$ клеток, в группе 10 мкг/мл – $476,33 \pm 43,80$ клеток, в группе 100 мкг/мл – $305,67 \pm 32,17$ клеток ($p < 0,05$ по сравнению с интактной группой) (рисунок 3).



* – $p < 0,05$ – различия статистически значимы

Рис. 3 – Изменение пролиферативной активности клеток глиомы С6 в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл

Исходя из полученных результатов можно предположить, что раствор клонидина в терапевтической концентрации 100 мкг/мл можно использовать не только как гипотензивное средство, но также для замедления роста и развития злокачественных опухолей головного мозга (глиом), что, конечно же, требует дальнейшего изучения данного препарата в экспериментах *in vivo*.

Выводы:

1. Раствор клонидина в концентрации 100 мкг/мл эффективен в целях замедления пролиферативной активности и жизнеспособности клеток глиомы С6 крысы *in vitro*.

2. При аппликации клонидином клеток глиомы С6 крысы в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл пролиферативная активность и жизнеспособность опухолевых клеток статистически значимо не изменяется.

Литература

1. Висмонт, Ф. И. Общая патофизиология: учеб. пособие / Ф. И. Висмонт, Е. В. Леонова, А. В. Чантурия. – Минск: Вышэйшая школа, 2011. – 364 с.
2. 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.
3. 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. Сeryя хімічных навук. – 2015. – № 2. – С. 86-88.
4. Bruzzone, A. α 2-Adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice / A. Bruzzone et al. // Br J Pharmacol. – 2008. – Vol. 155, № 4. – P. 494-504.
5. Cole, S. W. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment / S. W. Cole et al. // Nat. Rev. Cancer. – 2015. – Vol. 15, № 9. – P. 563.
6. Jovčevska, I. Glioma and glioblastoma how much do we (not) know? / I. Jovčevska, N. Kočvar, R. Komel // Molec. and Clin. Oncology. – 2013. – Vol. 1, № 6. – P. 935-941.
7. Watkins, S. Disruption of astrocytevascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells / S. Watkins // Nature Commun. – 2014. – Vol. 5. – P. 4196.
8. Nguyễn, L. T. H. The roles of beta-adrenergic receptors in tumorigenesis and the possible use of beta-adrenergic blockers for cancer treatment: possible genetic and cell signaling mechanisms / L. T. H. Nguyễn // Cancer Manag. and Res. – 2012. – Vol. 4. – P. 431.
9. Qiao, G. Adrenergic signaling: a targetable checkpoint limiting development of the anti-tumor immune response / G. Qiao et al. // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – P. 164.
10. Song, Q. The role and mechanism of β -arrestins in cancer invasion and metastasis / Q. Song, Q. Ji, Q. Li // Intern. J. of Molecular Med. – 2018. – Vol. 41, № 2. – P. 631-639.