

## АНТИКАНЦЕРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛОНИДИНА НА ПЕРЕВИВАЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ГЛИОМЫ

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

*Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра патологической физиологии, г. Минск  
\*Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск*

**Ключевые слова:** клонидин, клетки глиомы С6 крысы, пролиферативная активность, жизнеспособность, эффективная концентрация.

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

**Resume:** find out 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  $\mu\text{g} / \text{ml}$  is effective in order to slow the growth and development of C6 rat glioma cells. At the same time, when clonidine was applied to C6 rat glioma cells at concentrations of 10  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and 1  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , the proliferative activity and viability of tumor cells did not change significantly.

**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 [3].

Глиома является опухолью, входящей в гетерогенную группу и имеющую нейроэктодермальное происхождение. Глиомы являются злокачественными формами опухолей головного мозга и составляют около 30% всех новообразований [3]. Средняя продолжительность жизни у пациентов с момента постановки диагноза составляет приблизительно 15 месяцев, менее 5% пациентов живут дольше 5 лет из-за 80%-го рецидива агрессивной глиомы [4]. 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 [5]. Образование глиомы характеризуется высокой плотностью микрососудов, в которых выявляется масса дефектов, аномальная морфология и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера.

В последнее десятилетие становится очевидным, что связанная со стрессом активация симпатoadреналовой нервной системы играет важную роль в развитии опухолей, а также в регуляции микрососудов головного мозга [6]. 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 [7]. 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, 9]. Однако роль альфа2-адренорецепторов (А2-АР) в механизмах, ответственных за прогрессирование (пролиферацию и жизнеспособность) глиом, остается не до конца изученной [10].

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 [2]. Клонидин является широко распространенным и популярным средством, используемым в качестве обезболивающего препарата для пациентов со злокачественной симптоматической гипертензией для уменьшения внутричерепного давления.

**Цель:** изучение жизнеспособности и пролиферативной активности клеток глиомы С6 крыс при аппликации клонидином в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл в эксперименте *in vitro*.

**Задачи:** 1. Изучить жизнеспособность клеток глиомы С6 крыс при аппликации клонидином в эксперименте в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл *in vitro*; 2. Оценить пролиферативную активность клеток глиомы С6 крыс при аппликации клонидином в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл в эксперименте *in vitro*.

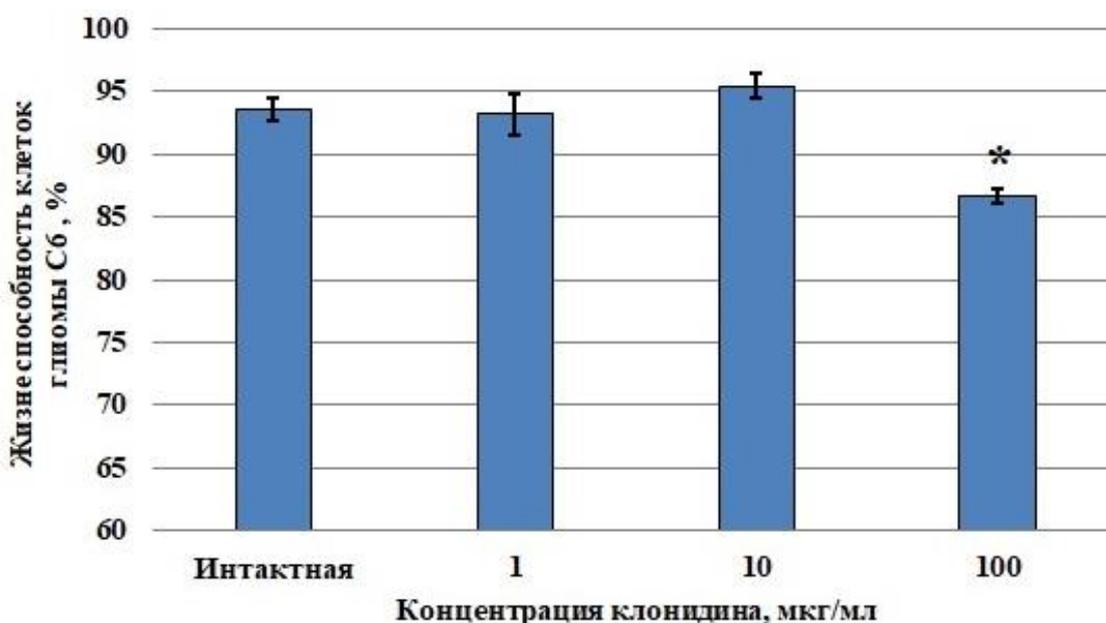
**Материал и методы исследования.** Исследование проведено на базе лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Института физиологии НАН Беларуси» (Республика Беларусь, г. Минск) на перевиваемой культуре клеток глиомы С6 крысы, полученной из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии 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 [15]. Чашки Петри размещали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (ShellLab Series 3517, США) при 5% CO<sub>2</sub> 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.

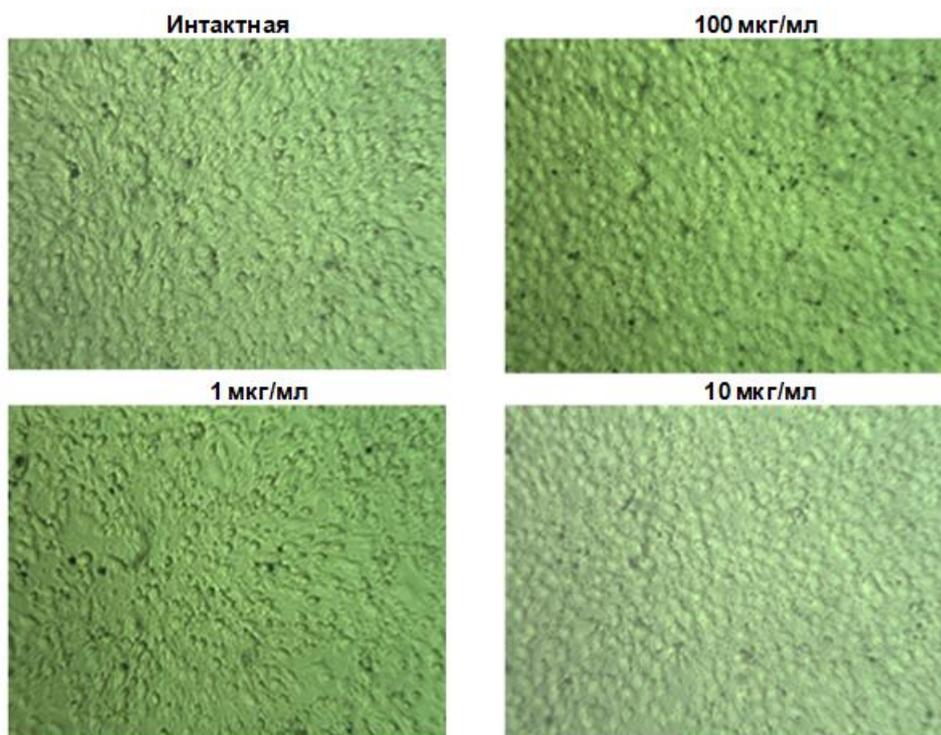
Изменение пролиферативной активности клеток проводили путем анализа прироста клеточной массы. Для этого до начала и через 24 часа после начала эксперимента осуществлялось фотографирование в месте метки трех случайно выбранных полей, после чего оценивалась разница в изменении клеточной массы. Данные представлены 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 исследования и их обсуждение.** При анализе жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 крыс были получены следующие данные: в интактной группе жизнеспособность составила  $93,63 \pm 0,89\%$ , в группе 1 мкг/кг –  $93,18 \pm 1,64\%$ , в группе 10 мкг/кг –  $95,42 \pm 0,98\%$ , в группе 100 мкг/кг –  $86,63 \pm 0,61\%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с интактной группой) (рисунок 1).



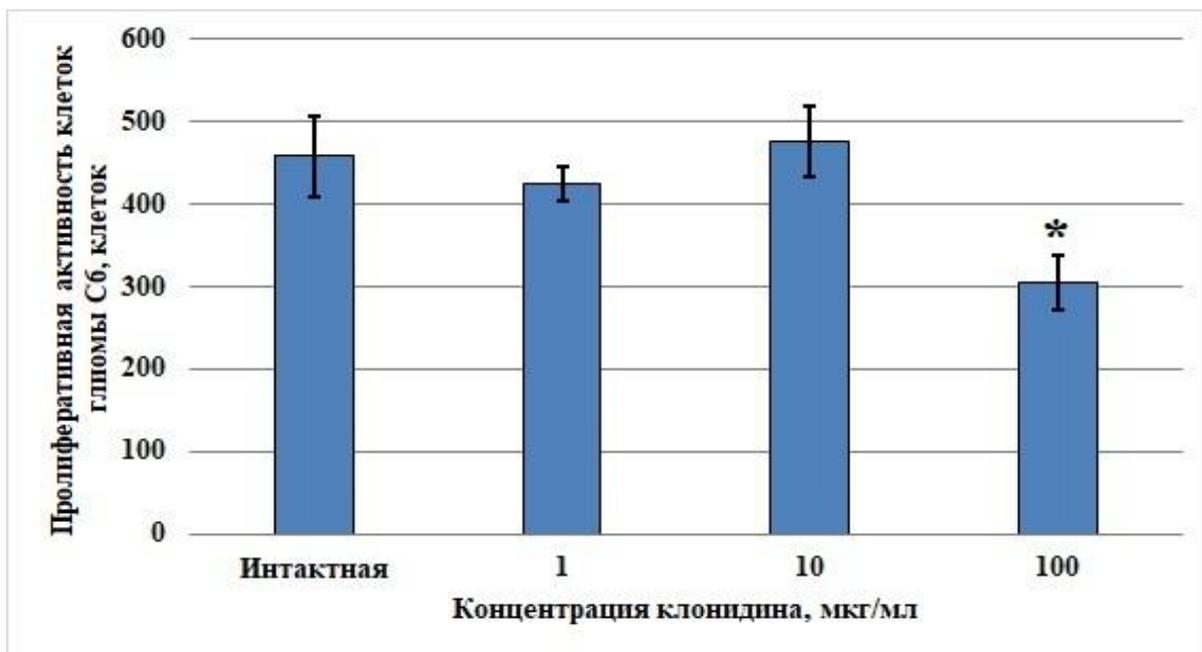
**Рис. 1** – Изменение жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 крыс в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл (\* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ))

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



**Рис. 3** – Изменение пролиферативной активности клеток глиомы С6 крыс в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл (\* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ))

**Выводы:** 1. Раствор клонидина в концентрации 100 мкг/мл эффективен в целях замедления роста и развития клеток глиомы С6 крыс в эксперименте *in vitro*; 2. В то же время при аппликации клонидином клеток глиомы С6 крыс в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл в эксперименте *in vitro* пролиферативная активность и жизнеспособность опухолевых клеток статистически значимо не изменяется; 3. Исходя из полученных результатов можно предположить, что раствор клонидина в терапевтической концентрации 100 мкг/мл можно использовать не только как гипотензивное средство, но и для замедления роста и развития злокачественных опухолей головного мозга (глиом), что также требует дальнейшего изучения данного препарата в экспериментах *in vivo*.

#### 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. Муфазалов, Ф. Ф. Современная тактика лечения злокачественных глиом головного мозга и случай полного ответа опухоли на фоне длительного приема бевацизумаба / Ф. Ф. Муфазалов и др. // Злокачественные опухоли. – 2017. – № 2. – С. 33-39.
4. Гутник, В. В. Клетки глиомы С6 крысы и их жизнеспособность, и пролиферативная активность в условиях аппликации клонидином *in vitro* / В. В. Гутник, Д. А. Готкович // Актуальные вопросы современной медицины: материалы III Дальневосточного медицинского молодежного форума. – Хабаровск: Изд-во ДВГМУ, 2019. – С. 490-493.

5. Хороводов, А. П. Развитие флуоресцентной глиомы у крыс в условиях фармакологической модуляции бета2-адренорецепторов / А. П. Хороводов и др. // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, Вып. 4, – С. 446-450.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. Гутник, В. В. Аппликация клонидином клеток глиомы С6 крыс *in vitro*: жизнеспособность и пролиферативная активность / В. В. Гутник, Д. А. Готкович, С. Н. Чепелев // Материалы V Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» / ред. кол.: Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Е.В. Филиппов, И.А. Федотов; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань, 2019. – С. 100-101.

10. Bruzzone, A.  $\alpha$ 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.