

В.В. Гутник¹, Д.А. Лепетило¹, С.Н. Чепелев¹, М.О. Досина²

**ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СНИЖЕНИИ
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК
ГЛИОМЫ С6 КРЫСЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА НИХ КЛОНИДИНА**

¹Белорусский государственный медицинский университет,

кафедра патологической физиологии, г. Минск

²Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск

V.V. Gutnik¹, D.A. Lepetilo¹, S.N. Chepelev¹, M.O. Dosina²

**POSSIBLE MECHANISMS INVOLVED IN THE REDUCTION OF VIABILITY
AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF RAT C6 GLIOMA CELLS UNDER THE
EXPOSURE TO CLONIDINE**

¹Belarusian State Medical University,

Department of Pathological Physiology, Minsk

²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

Резюме. Показано, что клонидин в концентрации 100 мкг/мл эффективен в целях замедления роста и развития клеток глиомы С6 крысы. Предполагается, что в механизмах, участвующих в замедлении роста и развития клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином в концентрации 100 мкг/мл, участвуют альфа2-адренорецепторы и имидазолиновые рецепторы.

Ключевые слова: пролиферативная активность, жизнеспособность, клетки глиомы С6 крысы, альфа2-адренорецепторы, имидазолиновые рецепторы.

Resume: it has been shown that clonidine at a concentration of 100 µg/ml is effective in slowing down the growth and development of rat C6 glioma cells. Alpha2-adrenergic receptors and imidazoline receptors are assumed to be involved in the mechanisms involved in slowing down the growth and development of rat C6 glioma cells when clonidine is applied at a concentration of 100 µg/ml.

Keywords: proliferative activity, viability, rat C6 glioma cells, alpha2-adrenergic receptors, imidazoline receptors.

Актуальность. Новообразования являются самой частой причиной заболеваемости и смертности после сердечно-сосудистых заболеваний. Глиомы представляют собой злокачественные опухоли нейроэктодермального происхождения с высокой степенью злокачественности. В настоящее время основным методом лечения является хирургический с применением различных видов радиотерапии, химиотерапии и иммунотерапии. Поскольку глиальные опухоли склонны к дальнейшему росту, возникающему чаще всего на границе области циторедукции, актуальными в лечении являются методики интраоперационного локального воздействия на перифокальную зону и остаточную опухолевую ткань в случае парциального удаления.

Клонидин является неселективным агонистом альфа2-адренорецепторов (альфа2-АР), а также имидазолиновых рецепторов [1, 2].

В современной научной литературе имеются сведения об экспрессии альфа2-адренорецепторов (альфа2-АР) различными опухолевыми клетками. Альфа2-АР играет важную роль в ряде биологических процессов, таких как онкогенез, инвазия и метастазирование опухоли, что может обеспечивать теоретическую основу для

профилактики и лечения злокачественных новообразований [3, 4], но механизмы участия альфа2-АР в развитии глиомы до сих пор остаются до конца не изученными.

Сообщается, что альфа2-АР участвуют в пролиферации, росте, инвазии и апоптозе раковых клеток посредством регуляции различных молекул, тем самым внося вклад в прогрессирование опухоли. Экспериментальные исследования эффектов блокаторов альфа2-АР показывают неоднозначные антиканцерогенные результаты: в одних случаях они стимулируют развитие опухоли (дексмедетомидин усиливает пролиферацию клеток рака груди, рост опухоли и метастазирование) [3], а результаты других, напротив, – подавляют (дексмедетомидин и раувольсцин снижают пролиферацию и рост клеток рака молочной груди) [4].

Также в научной литературе имеются сведения об экспрессии на глиальных клетках имидазолиновых рецепторов, в частности I₂-имидазолиновых рецепторов [5]. Доказано, что агонисты I₁-имидазолиновых рецепторов, к числу которых относится и клонидин, стимулируют развитие апоптоза [6]. Таким образом, представляется актуальным в настоящее время выяснение поведения (жизнеспособности, пролиферативной активности) глиальных клеток опухолей при контакте их мембраны с раствором, содержащим разные концентрации клонидина.

Цель: выяснить возможные механизмы, участвующие в снижении жизнеспособности и пролиферативной активности клеток глиомы С6 крысы при воздействии на них клонидина.

Задачи:

1. Выяснить пролиферативную активность и жизнеспособность клеток глиомы С6 крысы после аппликации клонидина в различных концентрациях *in vitro*;
2. проанализировать возможные механизмы, принимающие участие в снижении пролиферативной активности и жизнеспособности клеток глиомы С6 крысы при аппликации на них клонидина.

Материалы и методы. Работа выполнена 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 СО₂-инкубаторе (ShellLab Series 3517, США) при 5% СО₂ 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.

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 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).

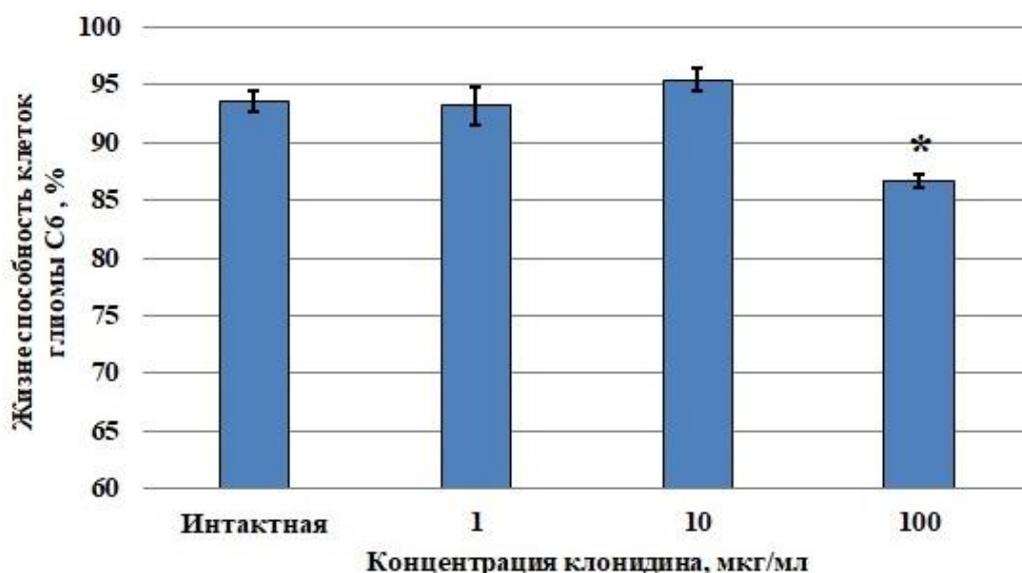


Рис. 1 – Изменение жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 крыс в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл (* – различия статистически значимы ($p < 0,05$))

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 2).

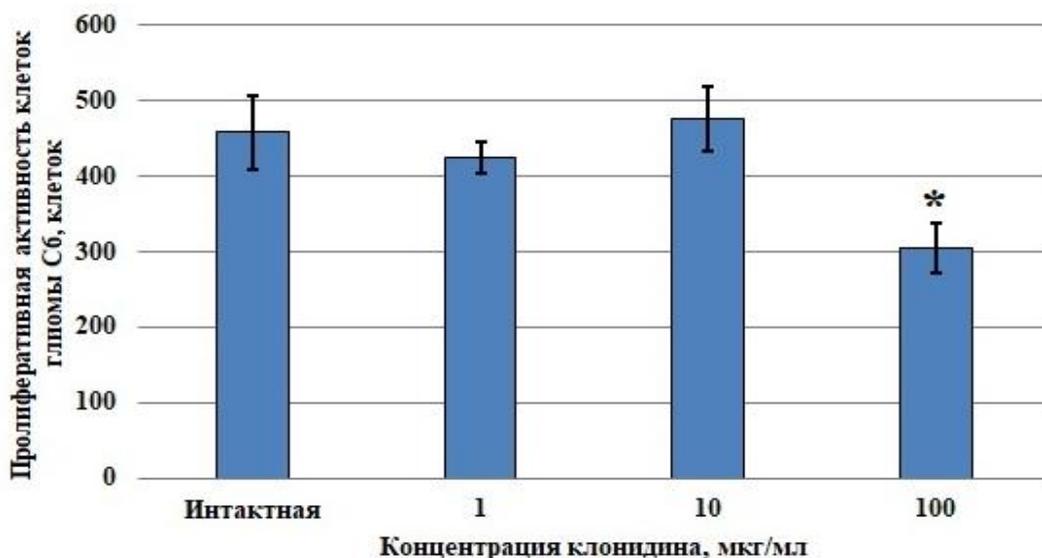


Рис. 2 – Изменение пролиферативной активности клеток глиомы С6 крыс в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл (* – различия статистически значимы ($p < 0,05$))

Таким образом, было установлено, что раствор клонидина в концентрации 100 мкг/кг эффективен в целях замедления пролиферативной активности, а также жизнеспособности клеток глиомы С6 крысы *in vitro*. Полученные результаты имеют большую значимость для фундаментальной медицины. Необходимо дальше продолжать исследование раствора клонидина и его эффектов, в частности в экспериментах *in vivo*.

Участие альфа2-АР в возможных механизмах снижения пролиферативной активности и жизнеспособности клеток глиом подтверждается в ниже представленных исследованиях.

Тизанидин гидрохлорид (ТНС), который является агонистом альфа2-АР, подавлял пролиферацию, миграцию и инвазию клеток остеосаркомы, способствовал апоптозу в этих клетках. Кроме того, уровни экспрессии ключевых белков в сигнальном пути фосфатидилинозитол-3-киназы / протеинкиназы В были снижены при воздействии ТНС, что предполагает участие передачи сигналов в индуцированном ТНС апоптозе в клетках остеосарком [7].

Имеются сведения, указывающие, что альфа2-АР усиливают Na^+/H^+ обмен в клетках глиомы, защищая их от возможного ацидоза. Установлено, что обмен Na^+/H^+ в клетках глиомы ускоряется альфа2-АР [8].

Также имеются сведения, что клонидин влияет на кальциевые ионные каналы в клетках глиомы, а ионы кальция, в свою очередь, играют важную роль в регуляции клеточных процессов. Ионы кальция представляют собой универсальные пространственные и временные внутриклеточные сигналы невозбудимых клеток и оказывают влияние почти на все аспекты клеточной жизни, контролируя рост клеток, метаболизм, секрецию жидкости, обработку информации, транскрипцию, апоптоз и подвижность. Нейроны и глия реагируют на стимулы, включая нейротрансмиттеры, нейромодуляторы и гормоны, которые увеличивают внутриклеточную концентрацию

кальция. Функция внутриклеточного кальция в глиомах неизвестна. На сегодняшний день неизвестно, обладают ли рецепторы кальциевых каналов поддерживающим или ингибирующим действием на пролиферацию глиомы и инвазию глиомы [9].

Кроме того, клонидин является неселективным агонистом имидазолиновых рецепторов, которые также имеются на поверхности глиальных клеток. В исследовании на линии раковых клеток крови (K562) показано, что агонисты I₁-имидазолиновых рецепторов запускают процессы клеточного апоптоза [6].

Выводы: 1. Установлено, что клонидин в концентрации 100 мкг/мл приводит к снижению пролиферативной активности и жизнеспособности клеток глиомы С6 крысы в эксперименте *in vitro*; 2. Исходя из полученных результатов можно предположить, что аппликацию клонидина в концентрации 100 мкг/мл можно использовать для замедления роста и развития злокачественных опухолей головного мозга (глиом), что также требует дальнейшего продолжения изучения аппликации клонидина на клетки глиомы в экспериментах *in vivo*, а также изучение влияния селективных агонистов альфа2-АР и имидазолиновых рецепторов на жизнеспособность и пролиферативную активность глиомы.

Литература

1. Reis, D. J. The imidazoline receptor in control of blood pressure by clonidine and allied drugs / D. J. Reis, J. E. Piletz // *Am J Physiol.* – 1997. – Vol. 273, № 5. – P. R1569–R1571.
2. Alpha 2-adrenergic receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. Characterization with agonist and antagonist radioligands and relationship to adenylate cyclase / D. J. Kahn, J. C. Mitrius, D. C. U'Prichard // *Mol Pharmacol.* – 1982. – Vol. 21, № 1. – P. 17–26.
3. Alpha2-adrenoceptor agonists trigger prolactin signaling in breast cancer cells / L. F. Castillo, E. M. Rivero, V. Goffin [et al.] // *Cellular Signaling.* – 2017. – №34. – P. 76–85.
4. α 2-Adrenoceptors enhance cell proliferation and mammary tumor growth acting through both the stroma and the tumor cells / A. Bruzzone, C. P. Piñero, P. Rojas [et al.] // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2011. – № 11. – P. 763–774.
5. Imidazoline I(2) receptor density increases with the malignancy of human gliomas / L. F. Callado, J. I. Martín-Gómez, J. Ruiz [et al.] // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2004. – Vol. 75, № 5. – P. 785–787.
6. Imidazoline-1 Receptor Ligands as Apoptotic Agents: Pharmacophore Modeling and Virtual Docking Study / K. Nikolic, N. Veljkovic, B. Gemovic [et al.] // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening.* – 2013. – Vol. 16, № 4. – P. 298–319.
7. Tizanidine hydrochloride exhibits a cytotoxic effect on osteosarcoma cells through the PI3K/AKT signaling pathway. /X.-W. Xing, Y.-F. Sun, J. Zhao [et al.] // *J Int Med Res.* – 2019. – Vol. 47, № 8. – P. 3792–3802.
8. Isom, L. L. A2-Adrenergic Receptors Accelerate Na⁺/H⁺ Exchange in Neuroblastoma X Glioma Cells / L. L. Isom, E. J. Cragoe Jr., L. E. Limbird // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol. 262, № 14. – P. 6750–6757.
9. Glioblastoma cells express functional cell membrane receptors activated by daily used medical drugs / S. A. Kuhn, U. Mueller, U.-K. Hanisch [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 135, № 12. – P. 1729–1745.