



Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Белорусский государственный медицинский университет



Подготовили:

Готкович Данута Анатольевна
(4 курс, педиатрический факультет)
Гутник Ванесса Васильевна
(4 курс, лечебный факультет)

Научные руководители:

Чепелев Сергей Николаевич, ст. преп.
Досина Маргарита Олеговна, к.б.н., ведущий
научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии
ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»

**ИЗУЧЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ
АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ГЛИОМЫС6 КРЫСЫ ПРИ
АПЛИКАЦИИ КЛОНИДИНОМ**

Минск, 2020

Актуальность



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**. 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. Плохая реакция на лечение, высокая частота рецидивов и низкие показатели продолжительности жизни делают глиому одним из наиболее опасных новообразований.

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. Клинические исследования показывают, что глиома часто ассоциируется с высоким уровнем катехоламинов, в особенности адреналина, а блокада **бета₂-адренорецепторов** улучшает результаты лечения больных данным раком.

Однако роль **альфа₂-адренорецепторов (A₂-AR)** в механизмах, ответственных за прогрессирование (пролиферацию и жизнеспособность) глиом, остается недостаточно изученной.

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.

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.

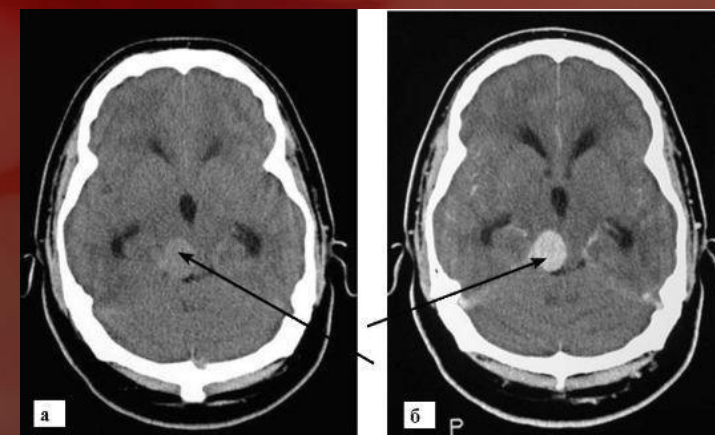
Qiao G. Adrenergic signaling: a targetable checkpoint limiting development of the anti-tumor immune response / G. Qiao et al. // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – P. 164.

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.

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.

Клонидин (агонист А2-АР) является широко распространенным и популярным средством, используемым в качестве обезболивающего препарата для пациентов со злокачественной симптоматической гипертензией для снижения повышенного уровня артериального давления.

Так, актуальным в настоящее время представляется уточнение вопроса о поведении клеток глиальных опухолей при контакте их мембраны с раствором, содержащим разные концентрации клонидина, поскольку доказано, что рецепторы, чувствительные к клонидину, содержатся на мембране некоторых опухолей ГОЛОВНОГО МОЗГА.



Цель и задачи исследования

Цель:

- ✓ Выяснить **жизнеспособность** и **пролиферативную активность** клеток глиомы С6 крысы после аппликации клонидином.



Задачи:

- ✓ Оценить **жизнеспособность** клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином.
- ✓ Определить **пролиферативную активность** клеток глиомы С6 крысы при аппликации клонидином.





Объект исследования:

- ✓ Клеточная линия С6 (глиома крысы).

Предмет исследования:

- ✓ Процессы пролиферации опухолевых клеток.
- ✓ Жизнеспособность опухолевых клеток.



Рис. 1, 2 — Определение количества жизнеспособных клеток путем окраски препарата трипановым синим

Материалы и методы исследования

- ✓ Исследование проведено на базе лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Института физиологии НАН Беларуси» (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 CO_2 -инкубаторе (ShellLab Series 3517, США) при 5% CO_2 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.

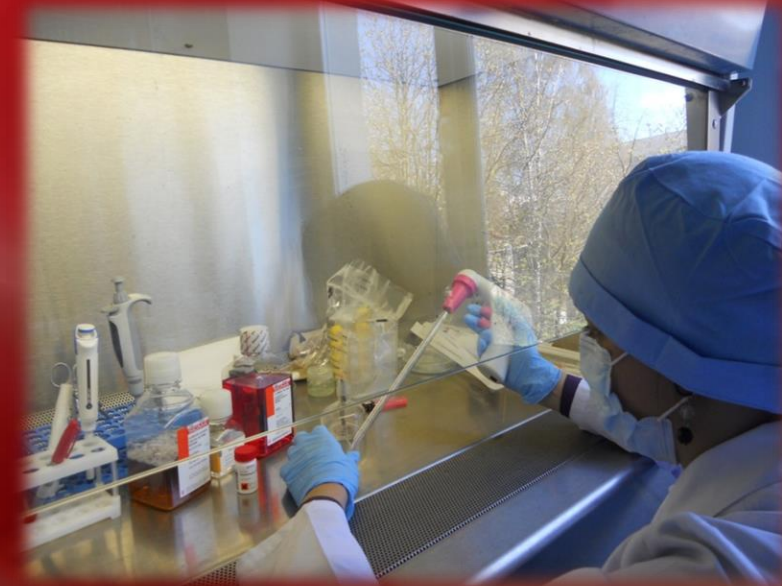


Рис. 3 — Культивирование клеток в условиях *in vitro*



✓ **Оценку жизнеспособности** культивируемых клеток осуществляли с помощью подсчета количества клеток на микроскопе **Opton ISM-405 (Германия)** после предварительной окраски **трипановым синим**.

✓ Жизнеспособные клетки при этом не окрашивались. Жизнеспособность определялась по формуле:

$$(\text{количество живых клеток/общее количество клеток}) * 100\%.$$

✓ 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**.

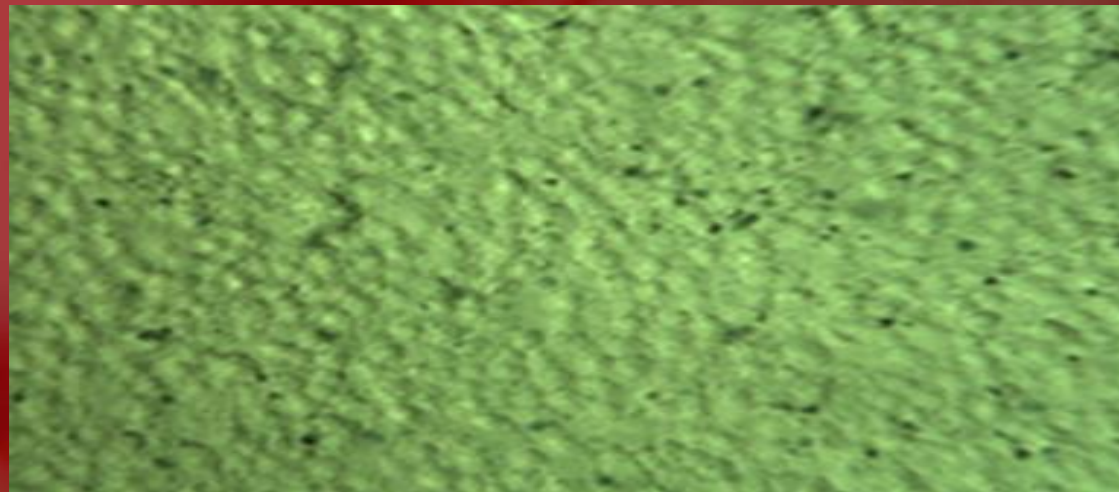


Рис. 4 — Микроскопическое изображение культивируемых клеток глиомы С6 крысы


- 
- ✓ **Изменение пролиферативной активности** клеток проводили путем анализа прироста клеточной массы.
 - ✓ Для этого до начала и через **24 часа** после начала эксперимента осуществляли фотографирование в месте метки трех случайно выбранных полей, после чего оценивали разницу в клеточной массе.
 - ✓ Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.



Рис. 5, 6 — Визуализация и фотографирование культуры клеток до и после аппликации клофелина

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 крысы были получены следующие данные:

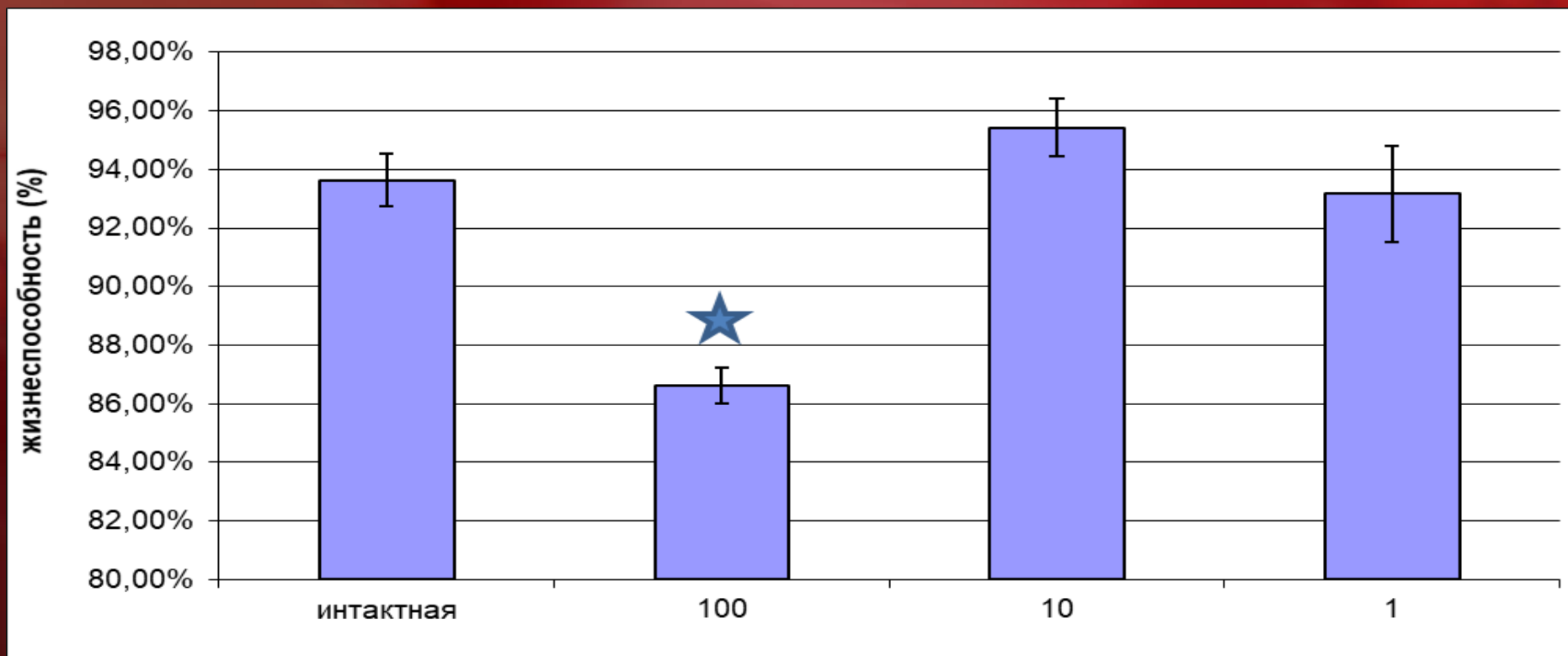
В интактной группе – $93,63 \pm 0,89\%$;

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).

Жизнеспособность клеток через 24 часа после аппликации клонидином в различных дозах



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

Рис. 7 — Изменения жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 крысы в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл

Жизнеспособность опухолевых клеток при различных концентрациях клонидина

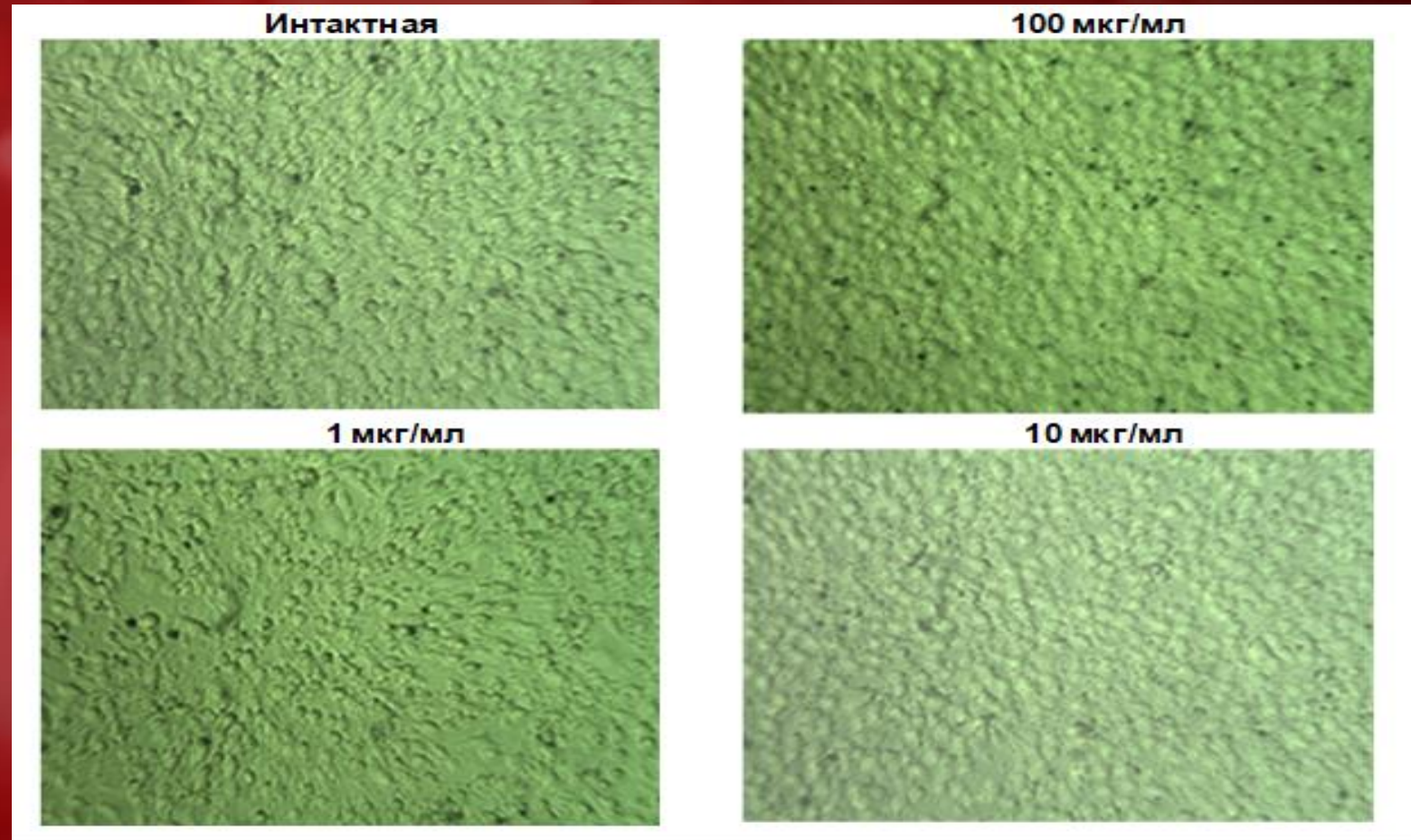


Рис. 8 — Микроскопические изменения жизнеспособности культивируемых клеток глиомы С6 в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл



При изучении пролиферативной активности культивируемых клеток глиомы С6 крысы были получены следующие данные:

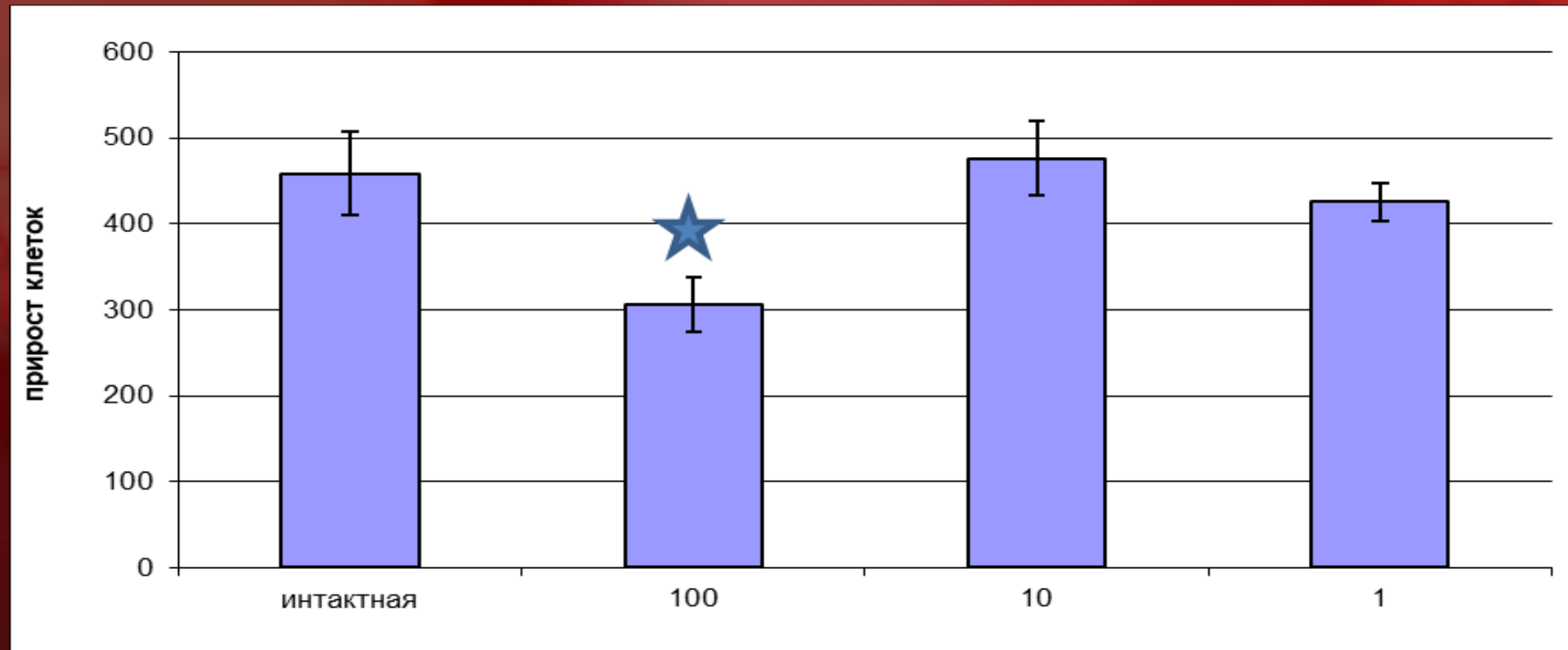
В интактной группе – $458,67 \pm 49,10$ клеток;

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).

Пролиферативная активность клеток после аппликации различных доз клонидина



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

Рис. 9 — Изменения пролиферативной активности клеток глиомы С6 крысы в интактной группе и в группах, в которых осуществлялась аппликация клонидина в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл

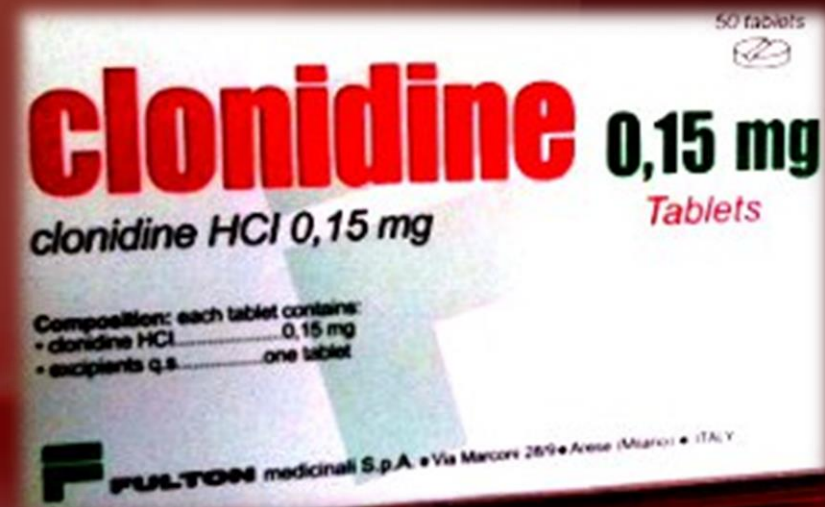


Выводы

- ✓ Раствор клонидина **в концентрации 100 мкг/мл** эффективен в целях замедления роста и развития клеток глиомы С6 крысы.
- ✓ В то же время при аппликации клонидином клеток глиомы С6 крысы **в концентрациях 10 мкг/мл и 1 мкг/мл** пролиферативная активность и жизнеспособность статистически значимо не изменяется.



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 требует также дальнейшего изучения данного препарата в экспериментах in vivo.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !

