

На правах рукописи



Киселева Любовь Николаевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ОБЛУЧЕНИЯ И ФОТЕМУСТИНА НА
ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ
ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Самойлович Марина Платоновна – доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Гужова Ирина Владимировна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, руководитель лаборатории защитных механизмов клетки, главный научный сотрудник

Данилова Анна Борисовна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научный отдел онкоиммунологии, старший научный сотрудник

Ведущее научное учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» сентября 2022 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.087.01 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д.2.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, д. 39, а также на сайте ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России: <https://gpmu.org/science/dissertation-councils/kd/kd01>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Кульбах Ольга Станиславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Глиобластомы являются одними из наиболее распространенных опухолей головного мозга человека. При выполнении стандартных протоколов комплексного лечения этого заболевания, включающих хирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию, выживаемость пациентов обычно не превышает 15 мес. После проведения стандартной терапии в значительном числе случаев возникают рецидивы, которые проявляют более высокую резистентность к терапии, чем исходные глиобластомы. Повышение резистентности опухолей к повторному воздействию связывают в первую очередь с селекцией клеточных популяций, более устойчивых к действию генотоксических факторов.

Глиобластомы представляют собой гетерогенную группу опухолей, которые различаются по клиническому течению и ответу на терапию. Опухоли, возникшие у разных пациентов, отличаются по морфологии, фенотипу и генетическим особенностям клеток. Согласно профилю генной экспрессии глиобластомы разделяют на четыре подтипа: классический, пронеуральный, нейральный и мезенхимальный [Verhaak R.G. et al., 2010]. Опухоли пронеурального подтипа характеризуются относительно благоприятным прогнозом, наиболее агрессивное течение свойственно мезенхимальному подтипу. Молекулярные признаки, определяющие принадлежность к тому или иному подтипу глиобластом, при рецидивировании могут изменяться. В рецидивирующих глиобластомах отмечено изменение экспрессии генов в сторону более агрессивного мезенхимального подтипа [Fedele M. et al., 2019]. В прогрессию глиобластом может быть вовлечен эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), для которого характерно увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров и приобретение клетками мезенхимного фенотипа. Важными условиями выживаемости клеток глиобластом после лучевой или химиотерапии является проявление в них активности ростовых факторов, таких как эпидермальный ростовой фактор (EGF), трансформирующий ростовой фактор β (TGF β), фактор роста фибробластов (FGF2(b)), а также продукция белков внеклеточного матрикса. Вышеизложенное свидетельствует об актуальности проведения исследования действия облучения и химиопрепаратов на выживаемость, популяционный состав и изменения активности ряда генов, определяющих прогрессию опухолей, на культивируемых линиях глиобластом человека.

При лучевой терапии глиобластом стандартным режимом воздействия является фракционированное облучение в дозе 2 Гр с суммарной очаговой дозой 60 Гр [Клинические рекомендации, 2020]. Одним из направлений в лечении глиобластом является использование химиотерапевтических препаратов из группы производных нитрозомочевины, в частности фотемустина (ФМ), который применяют при лечении рецидивирующих злокачественных глиом. В отличие от других соединений нитрозомочевины ФМ образует меньше разрывов ДНК

и больше сшивок между молекулами ДНК или ДНК и белками. В литературе количество сведений о влиянии этого препарата на клетки глиобластом очень ограничено.

Цель исследования. Оценить действие облучения и препарата фотемустин на выживаемость и популяционный состав клеток культивируемых линий глиобластом, а также на активность в них генов факторов, влияющих на прогрессию опухолей.

Степень разработанности темы. Глиобластомы обладают высокой гетерогенностью, которая проявляется, в частности, в различной чувствительности и реакции клеток на воздействие лучевой и химиотерапии. Более высокой устойчивостью по сравнению с обычными опухолевыми клетками к действию генотоксических факторов обладают стволовые клетки глиобластом, которые являются инициаторами опухолевого роста. Панель маркеров, идентифицирующих эти клетки, до настоящего времени не определена. Причиной этому может служить высокая гетерогенность глиобластом. Выделяют стволовые клетки proneйрального и мезенхимального типов, которые различаются по фенотипическим и генетическим особенностям [Никитин П.В. и др., 2019; Guardia G.D. et al., 2020]. Стволовые клетки мезенхимального типа обладают устойчивостью к действию генотоксических факторов. Стволовые клетки proneйрального типа исходно чувствительны к таким воздействиям, однако они могут становиться резистентными посредством перехода к мезенхимальному типу [Fedele M. et al., 2019]. Генотоксические факторы способствуют развитию в клетках глиобластом ЭМП, который регулируется множественными сигнальными путями [Mahabir R. et al., 2014; Kubelt C. et al., 2015]. Основными активаторами сигнальных путей, связанных с ЭМП, являются факторы роста TGF β , EGF, фактор роста гепатоцитов (HGF). В прогрессию глиобластом вовлечены также белки внеклеточного матрикса, которые продуцируют сами опухолевые клетки – тенасцин С (TNC) и тромбоспондин-1 (THBS1). Лабораторные исследования цитотоксического действия химиопрепаратов проводят на клеточных линиях, различающихся по своим характеристикам, однако такие исследования, как правило, краткосрочны и ограничены 7–14 днями. Формирование популяций резистентных клеток может занимать месяцы и не учитывается при проведении стандартных тестов. Исследование клеток глиобластом в отдаленные сроки после воздействия химиопрепаратов и облучения может дать ответы на вопросы, связанные с проблемой рецидивирования глиобластом.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать и сравнить новые клеточные линии глиобластом с широко используемыми линиями глиобластом A172 и T98G по скорости роста, присутствию внутриклеточных и поверхностных маркерных белков, активности генов, кодирующих ряд ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.

2. Определить параметры выживаемости культивируемых клеток глиобластом после воздействия различных доз ФМ и облучения в разных режимах.

3. Оценить действие ФМ в сублетальных дозах на популяционный состав клеточных линий глиобластом путем определения поверхностных маркеров, а также уровня экспрессии в клетках ряда генов ростовых факторов, генов белков внеклеточного матрикса и генов белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.

4. Оценить действие ионизирующего излучения в сублетальных дозах на популяционный состав клеток в линиях глиобластом по поверхностным маркерам и уровень экспрессии в клетках ряда генов ростовых факторов, генов белков внеклеточного матрикса и генов белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач были использованы культуральные, морфологические и иммуноцитохимические методы, проточная цитофлуорометрия, ПЦР в режиме реального времени. В качестве материала исследования использовали культуры клеточных линий глиобластом человека. Был разработан метод облучения клеточных культур на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System™. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

Научная новизна исследования. В результате исследования реакции клеточных линий глиобластом человека на действие ионизирующего излучения и ФМ были описаны факты, не отраженные ранее в научной литературе. Так было выделено два типа реагирования клеточных линий глиобластом на действие одних и тех же генотоксических факторов. Линии глиобластом A172 и R1, изначально содержавшие популяции клеток, экспрессирующих нейрональные маркеры CD56 и CD133, после действия облучения или ФМ в невысоких сублетальных дозах (36 Гр, 50 мкг/мл), характеризовались снижением активности генов ряда факторов, связанных с прогрессией опухолей. Снижение экспрессии было наиболее выражено для генов *HGF*, *TNC*, *TGFβ1*. На действие ионизирующего излучения или ФМ в высоких дозах (50 Гр, 300 мкг/мл) эти линии глиобластом отвечали гибелью всех популяций. В других линиях глиобластом (T98G и T2), не экспрессирующих нейрональные маркеры CD56 и CD133, после облучения или действия ФМ происходила активация генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и белков, связанных с мезенхимным фенотипом. Максимальное увеличение активности выявлено для генов *HGF*, *TNC* и *FAP*. Эти клеточные линии сохраняли жизнеспособность после генотоксических воздействий в высоких дозах за счет формирования гигантских непролиферирующих клеток (срок наблюдения 1,5–2 мес).

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, носят как фундаментальный, так и прикладной

характер. В работе были охарактеризованы две новые клеточные линии глиобластом R1 и T2, выделенные из опухолей пациентов с подтвержденным диагнозом «глиобластома», которые можно использовать в качестве модельных объектов в дальнейших исследованиях.

Действие ионизирующего излучения или фотемустина на линии глиобластом, не экспрессирующих нейрональные маркеры (CD56 и CD133), может приводить к формированию резистентных клеток, характеризующихся активацией генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса, влияющих на прогрессию опухолей (HGF, VEGF, TNC и других), а также белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения. Изучение ответа глиобластом, обладающих разным уровнем экспрессии нейрональных маркеров, на действие химиопрепаратов и облучения требует дополнительных исследований на большем количестве клеточных линий. Нейрональные маркеры CD56 и CD133 могут быть рассмотрены как потенциальные маркеры прогноза ответа опухоли на действие облучения или фотемустина.

Положения, выносимые на защиту:

1. Линии глиобластом характеризуются гетерогенностью и разной реакцией на действие химиопрепаратов и облучения. Действие ионизирующей радиации или ФМ в высоких дозах на одни линии глиобластом (A172 и R1) приводит к гибели клеточных культур, в других линиях (T98G и T2) выявляются резистентные непродливающиеся переживающие клетки.

2. В линиях глиобластом, которые исходно содержат популяции клеток, позитивных по нейрональным маркерам CD56 и CD133/2 (A172 и R1), после действия облучения или ФМ в сублетальных дозах отмечается снижение активности ряда генов ростовых факторов и генов белков внеклеточного матрикса. Это снижение наиболее выражено для генов *HGF*, *TGFβ1* и *TNC*.

3. В линиях глиобластом, которые не содержат популяции клеток, экспрессирующие нейрональные маркеры CD56 и CD133/2 (T98G и T2), после действия облучения или ФМ происходит увеличение активности ряда генов ростовых факторов, генов белков внеклеточного матрикса, а также генов белков, связанных с мезенхимным фенотипом. Максимальная активация выявлена для генов *HGF*, *TNC* и *FAP*.

4. В резистентных переживающих клетках глиобластом, выявленных после генотоксических воздействий, отмечается высокая экспрессия ряда генов, кодирующих факторы, влияющие на прогрессию опухолей: *HGF*, *TNC*, *VEGF*, *EGF*, *FGF2(b)*, *THBS1*.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов основана на использовании современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, статистической обработке результатов экспериментов. Материалы работы были представлены на 10-й конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2014», Санкт-Петербург (Санкт-Петербург, 2015 г.); I Петербургском международном

онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2015 г., постер); конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, 2015 г.); II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2016 г.); VI Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 2020 г.).

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из которых 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 5 тезисов докладов.

Соответствие паспорту специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Личный вклад автора в проведение исследования. Культивирование клеток, все экспериментальные части работы, морфологические исследования и проточная цитометрия были выполнены автором лично. Исследование проб методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени проводила Н.Л. Вартанян. Материалы, вошедшие в данную работу, обсуждались с соавторами и научным руководителем.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 18 таблиц и 19 рисунков. Библиографический указатель включает 151 публикацию на русском и английском языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе были использованы четыре линии глиобластом. Линии A172 и T98G, известные в научной литературе с 70-х годов XX века, были получены из коллекции клеточных культур НИИ гриппа МЗ РФ. Новые клеточные линии R1 и T2 были выделены из операционного материала пациентов в лаборатории клеточной биологии Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова.

Клетки линий глиобластом культивировали в ростовой среде, содержащей α -МЕМ (БиолоТ, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), глютамин и гентамицин (БиолоТ, Россия) при 37 °C и 5% CO₂. Клетки пересеивали, используя раствор из смеси трипсина и версена (БиолоТ, Россия). Ростовые характеристики клеточных культур определяли, подсчитывая количество клеток, снятых с поверхности флакона, с помощью кондуктометрического счетчика Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США).

Определение жизнеспособности клеток методом МТТ. В ростовую среду клеток вносили раствор МТТ (Sigma-Aldrich, США) (5 мг/мл). После 2,5 ч надосадочную жидкость удаляли и добавляли 150 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, США). Определение оптической

плотности проводили при 540 и 630 нм. Результаты были выражены в процентном отношении от контроля.

Морфологические исследования. Живые клетки фотографировали, используя инвертированный микроскоп со встроенной камерой Prima Vert (Carl Zeiss, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали после окраски 0,4%-ным раствором трипанового синего. Для морфологического анализа клетки фиксировали ледяным этанолом и окрашивали по Май-Грюнвальду Гимзе (Bio-Optica, Италия). Фотографировали, используя инвертированный микроскоп с цифровой камерой (Nikon, Япония).

Иммуноцитохимические исследования. Клетки культивировали в камерах на стеклах, затем фиксировали забуференным 3,8%-ным раствором формальдегида (Serosep, Ирландия). Присутствие маркерных белков выявляли с использованием антител к виментину, глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), S100 (Dako, Дания), β -тубулину III (Epitomics, США), а также Ki-67 (Thermo Scientific, США), Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазе (MGMT), p53 (Leica Biosystems, Германия). Для визуализации использовали набор реагентов Dako REAL EnVision Detection System-HRP/DAB+ (Dako, Дания). Ядра докрашивали гематоксилином (Histoline, Россия). Изображения получали с использованием сканера Leica SCN 400 (Leica Microsystems, Германия) при помощи программы Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Германия), а также микроскопа Axio Imager A2 с камерой AxioCam HRC (Carl Zeiss, Германия).

Проточная иммуноцитофлуориметрия. Клетки инкубировали с антителами 30 мин при 4°C. Для определения поверхностного фенотипа использовали антитела к маркерам CD29, CD31, CD34, CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD147, CD151, CD166 (Becton Dickinson, США), CD133/2 (Miltenyi Biotec, Германия), а также соответствующие изотипические контроли. Исследования проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur при помощи программы BD Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США).

ДНК цитометрия. Выделение и окраску ядер проводили с использованием набора реагентов Cycle Test Plus DNA (Becton Dickinson, США). Для сбора данных использовали программу CellQuest Pro (Becton Dickinson, США), результаты анализировали с помощью ModFit (Verity Software House, США).

Исследование активности генов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Life Technologies, США). В реакции обратной транскрипции использовали 500 нг РНК и random-праймер (Сибэнзим, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в присутствии Sybr Green (BioDye, Россия). В реакции использовали праймеры в концентрациях 200–300 нМ. Последовательности праймеров представлены в Таблице 1.

Таблица 1 — Последовательности праймеров, использованных для амплификации генов

Ген	Праймеры	Длина, п.н.	NCBI номер
<i>VEGF</i>	Прямой 5'–AGGGCAGAATCATCACGAAGT–3', Обратный 5'–AGGGTCTCGATTGGATGGCA–3'	75	NM_001025366.3
<i>FGF2(b)</i>	Прямой 5'–AGAAGAGCGACCCTCACATCA–3', Обратный 5'–CGGTTAGCACACACTCCTTTG–3'	82	NM_002006.6
<i>HGF</i>	Прямой 5'–GCTATCGGGGTAAAGACTTACA–3', Обратный 5'–CGTAGCGTACCTCTGGATTGC–3'	99	NM_001010931.3
<i>TGFβ1</i>	Прямой 5'–GGCCAGATCCTGTCCAAGC–3', Обратный 5'–GTGGGTTTCCAACCATTAGCAC–3'	202	NM_000660.7
<i>EGF</i>	Прямой 5'–TGTCCACGCAATGTGTCTGAA–3', Обратный 5'–CATTATCGGGTGAGGAACAACC–3'	133	NM_001178130.3
<i>αSMA</i>	Прямой 5'–GACGAAGCACAGAGCAAAAGAG–3', Обратный 5'–TGGTGATGATGCCATGTTCTATCG–3'	67	NM_001613.4
<i>FAP</i>	Прямой 5'–CAAAGGCTGGAGCTAAGAATCC–3', Обратный 5'–ACTGCAAACATACTCGTTCATCA–3'	165	NM_001291807.3
<i>TNC</i>	Прямой 5'–TCCCAGTGTTTCGGTGGATCT–3', Обратный 5'–TTGATGCGATGTGTGAAGACA–3'	131	NM_002160.4
<i>THBS1</i>	Прямой 5'–AGACTCCGCATCGCAAAGG–3', Обратный 5'–TCACCACGTTGTTGTCAAGGG–3'	157	NM_003246.4
<i>GAPDH</i>	Прямой 5'–GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC–3', Обратный 5'–CATGAGTCCTTCCACGATACC–3'	123	NM_001357943.2

Уровень экспрессии генов представляли в виде разницы (ΔCT) между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH*. CT – пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции. Для сравнения уровней экспрессии генов в клетках до и после воздействия ФМ или облучения использовали метод относительного количественного определения экспрессии гена (метод $2^{-\Delta\Delta CT}$). Экспрессия генов в интактных клетках была принята за единицу. Величина $2^{-\Delta\Delta CT}$ представляет собой кратность разницы между уровнем экспрессии гена в клетках до и после воздействия ФМ или облучения.

Воздействие фотемустина на клетки глиобластом. Фотемустин («Мюстофоран», Cenexi-Laboratoires Thissen S.A., Бельгия) растворяли в 96%-ном этаноле, хранили при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Раствор размораживали непосредственно перед внесением в клеточную культуру. Клетки культивировали до 70%-ного конфлюэнтного монослоя, затем в течение 1 ч в бессывороточной среде α -МЕМ с ФМ в концентрациях 0,5–750 мкг/мл. После удаления препарата клетки трижды отмывали средой без ФМ, затем каждые 2–3 сут проводили замену ростовой среды обычного состава.

Облучение клеточных линий глиобластом. Клеточные линии глиобластом подвергали действию фотонного пучка на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment SystemTM (Elekta,

Швеция) с энергией излучения 6 МэВ, с мощностью дозы 460 сГр/мин. Все клеточные линии облучали однократно в дозе 10 Гр. Во фракционированном режиме клетки облучали по 2 Гр/сут в течение 5 дней, затем после двухдневного перерыва продолжали облучение до достижения суммарной дозы 36 или 50 Гр. Для оценки повторного облучения клетки после однократного облучения в дозе 10 Гр, пересевали и вновь облучали в разовой дозе 20 Гр. Первую замену ростовой среды проводили через 1 ч после сеанса облучения.

Статистическая обработка. Эксперименты проводили в 3–6 повторностях. Для статистической обработки данных использовали программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. Вычисляли среднее арифметическое, медиану, среднее квадратичное отклонение. Для оценки достоверности различий небольших выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, с целью попарного сравнения показателей (величина $2^{-\Delta\Delta CT}$) применяли критерий Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $P \leq 0,05$. Полученные различия свидетельствуют только о тенденциях и направлении изменений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика клеток линий глиобластом

Все клеточные линии отличались между собой по морфологическим характеристикам и представляли гетерогенные популяции клеток (Рисунок 1).

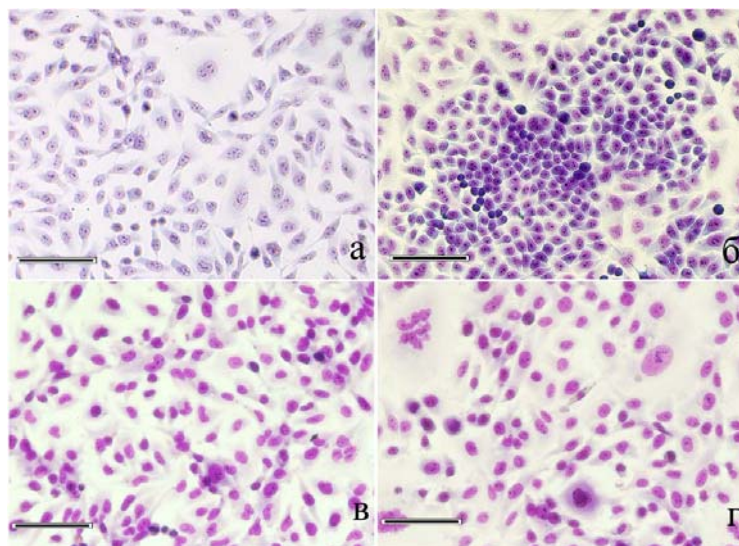


Рисунок 1 — Клеточные линии: A172 (а), T98G (б), R1 (в), T2 (г). Окраска по Май-Грюнвальду Гимзе. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Во всех исследуемых линиях отмечено присутствие многоядерных клеток. Наиболее часто такие клетки встречались в линии T2, наиболее редко – в R1. Во всех линиях был выявлен нейральный маркер β -тубулин III и мезенхимный маркер виментин, в то время как глиальный маркер GFAP не обнаружен. Присутствие белка S100 отмечено только в линии T98G. Белок p53 обнаружен в клетках линий A172, T98G и T2 и в небольшой части (около 20 %) клеток линии

R1. Фермент MGMT не был обнаружен только в линии A172. Линия R1, по сравнению с другими линиями представляла собой более гетерогенные популяции клеток, отличающиеся по экспрессии β -тубулина III, белка p53 и MGMT (Рисунок 2, Таблица 2). Клетки исследуемых линий обладали высокой пролиферативной активностью. Время удвоения в логарифмической фазе роста линии A172 составляло 33–48 ч, для T98G – 26–36 ч, R1 – 36–40 ч, в T2 – 32–36 ч.

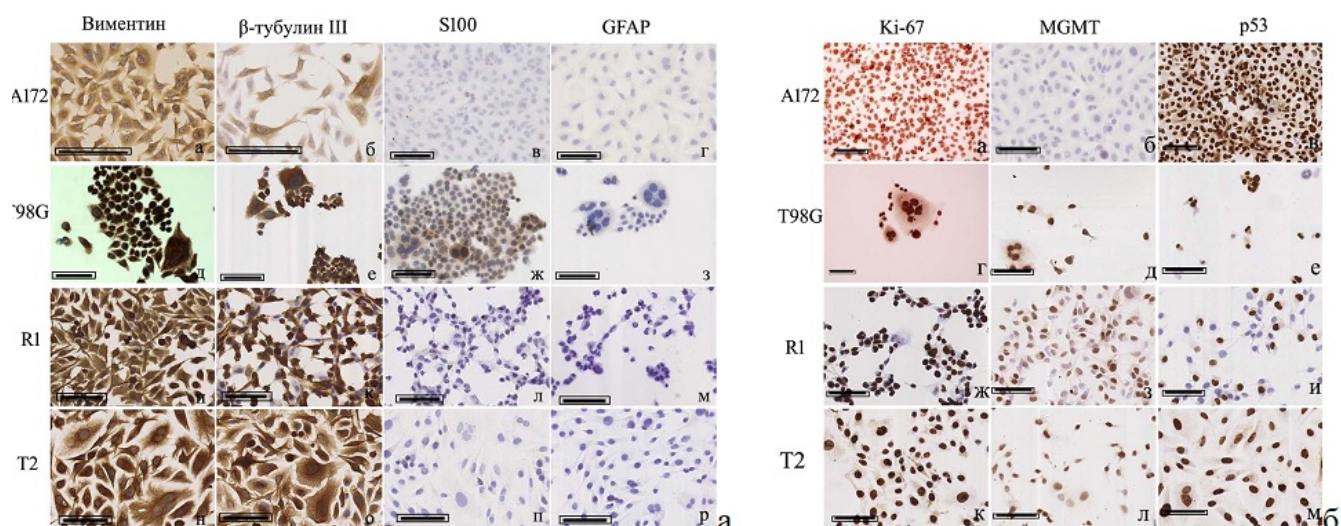


Рисунок 2 — Иммуноцитохимическое исследование клеток линий A172, T98G, R1, T2 на антигены: а) виментин, β -тубулин III, S100, GFAP; б) Ki-67, MGMT, p53. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Таблица 2 — Присутствие внутриклеточных маркеров в линиях глиобластом

Линии	GFAP	Виментин	β -тубулин III	S100	MGMT	p53	Ki-67
A172	—	+	+	—	—	+	+
T98G	—	+	+	+	+	+	+
R1	—	+	+	—	+	+	+
T2	—	+	+	—	+	+	+

Примечание. «+» — маркер выявлен, «—» — маркер не выявлен, «+*» — отмечена гетерогенность экспрессии маркера в популяциях клеток.

Воздействие фотемустина на клетки глиобластом

Для определения дозовой зависимости действия ФМ на выживаемость клеток глиобластом были использованы линии A172 и T98G. Клетки обрабатывали раствором ФМ в концентрациях 0,5–750 мкг/мл и на 7-е сутки определяли количество клеток, снятых с культуральной поверхности. ЛД₅₀ для клеток линии A172 составила 60 мкг/мл, для линии

T98G – 250 мкг/мл. Большинство интактных клеток A172 и T98G находились в фазе G₁. Через 48 ч после действия ФМ большинство клеток этих линий были в фазе G₂ (Рисунок 3).

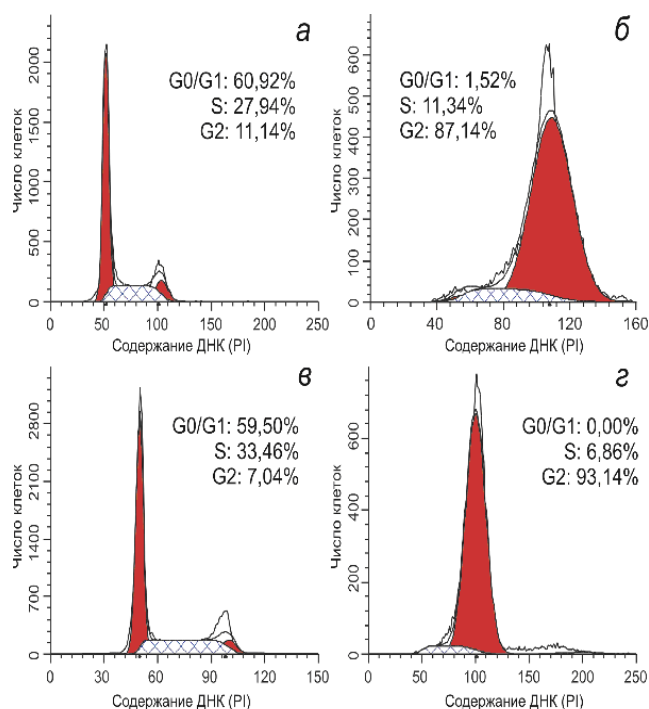


Рисунок 3 — Гистограмма распределения клеток линий A172 (а, б) и T98G (в, г) по фазам клеточного цикла в контроле (а, в) и через 48 ч после действия ФМ в дозах 50 мкг/мл (б) и 300 мкг/мл (г). ДНК-цитометрия. По горизонтали — интенсивность флуоресценции пропидия иодида (PI), по вертикали — число клеток.

Действие ФМ приводило к изменению морфологии клеток во всех исследуемых линиях. Клетки A172 и R1 через 3 сут после действия препарата в сублетальных дозах (50 и 100 мкг/мл) приобретали вытянутую форму с длинными отростками, появлялись клетки с фрагментированными ядрами, характерными для поздних стадий апоптоза (Рисунок 4 д, е). В линиях T98G и T2 после действия ФМ в дозах 100–300 мкг/мл отмечались одноядерные и многоядерные клетки большого размера (Рисунок 4 ж, з).

Клетки глиобластом A172 и R1 проявили более высокую чувствительность к повреждающему действию ФМ, чем клетки T98G и T2. При относительно низких дозах ФМ происходила гибель всех клеток в культурах A172 и R1. В линиях T98G и T2 после действия ФМ в дозе 100 мкг/мл выявлялись две популяции – пролиферирующих и непролиферирующих клеток. При увеличении дозы ФМ до 300 мкг/мл в культурах T98G и T2 отмечались только непролиферирующие одноядерные и многоядерные клетки крупного размера, которые сохраняли жизнеспособность на протяжении длительного срока (срок наблюдения 1,5 мес). Такие клетки в дальнейшем изложении обозначаются как переживающие. Таким образом, по реакции на действие ФМ клеточная линия A172 обладала сходством с R1, а T98G с линией T2. Эффекты действия ФМ на выживаемость и пролиферацию клеток глиобластом суммированы в Таблице 3.

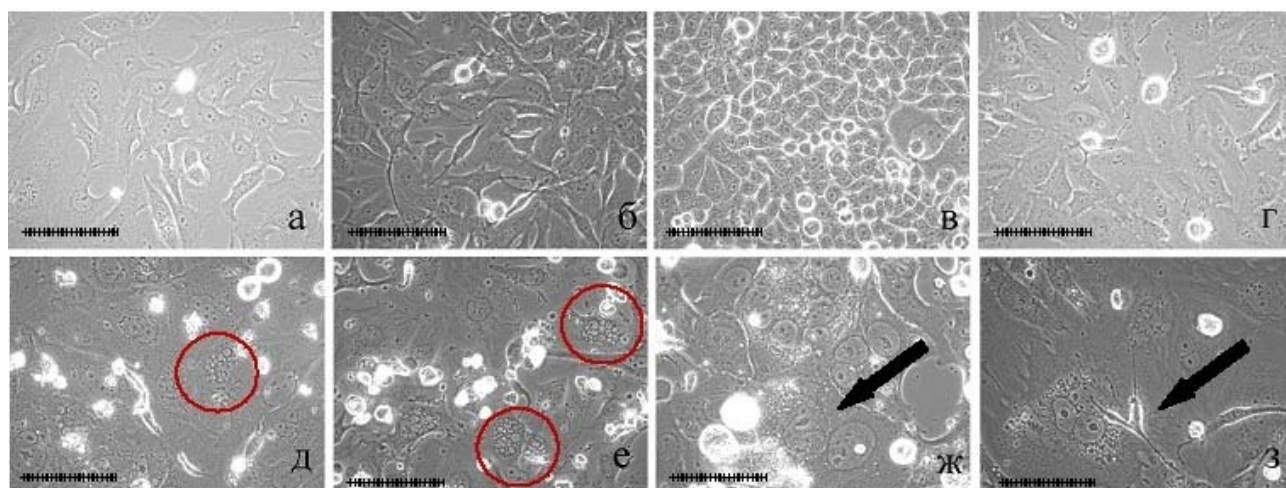


Рисунок 4 — Клетки линий A172 (а, д), R1 (б, е), T98G (в, ж), T2 (г, з): а, б, в, г – контроль; д, е – через 3 сут после действия ФМ в дозах 50 и 100 мкг/мл, соответственно; ж, з – через 15 сут после действия ФМ в дозе 300 мкг/мл. Фазовый контраст. Фрагментированные ядра отмечены кругами. Стрелки указывают на крупные многоядерные клетки. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Таблица 3 — Действие фотемустина на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

Доза ФМ, мкг/мл	Клеточная линия			
	A172	R1	T98G	T2
Первое воздействие ФМ				
50	ПК (16)	ПК (13)	НО	ПК (25)
100	Гибель	ПК (31)	ПК (9)	ПК (46)
300	Гибель	Гибель	ПЖК	ПЖК
750	Гибель	Гибель	ПЖК	ПЖК
Повторное воздействие ФМ*				
100	ПК (19)	ПК (7)	ПК (6)	ПК (26)
200	Гибель	НО	ПК (9)	НО
300	Гибель	Гибель	ПК (14)	ПЖК
400	Гибель	Гибель	ПЖК	НО
500	Гибель	Гибель	ПЖК	НО

Примечание. В скобках указано время (сут) от момента окончания действия ФМ до достижения культурой 70%-ного конfluence. * – Клетки после первого действия ФМ в дозах 50 мкг/мл для A172, и 100 мкг/мл для остальных линий культивировали, пересевали и воздействовали ФМ повторно; ПК – пролиферирующие клетки, ПЖК – переживающие клетки, НО – не определяли.

Повторная обработка клеток T98G, перенесших первое воздействие ФМ (100 мкг/мл), в дозе 300 мкг/мл не препятствовала появлению очагов пролиферации (Рисунок 5 а). При

увеличении дозы ФМ в культуре T98G оставались только переживающие клетки (Таблица 3, Рисунок 5 б).

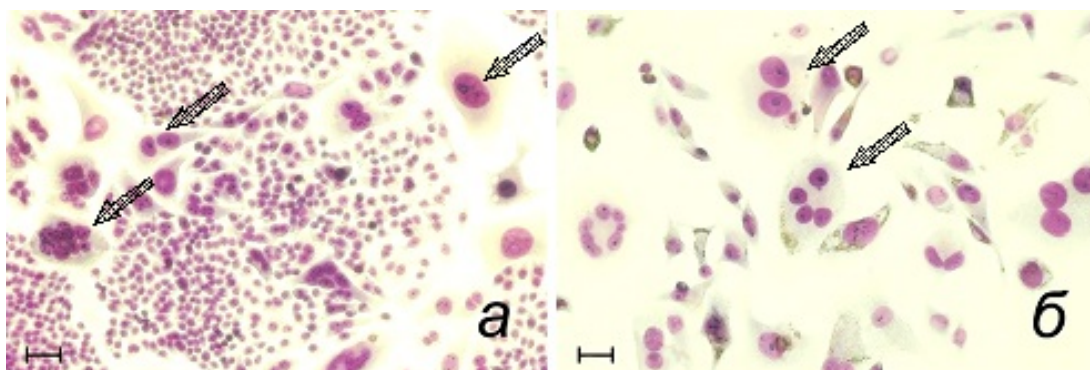


Рисунок 5 — Клетки линии глиобластомы T98G, перенесшие первое воздействие ФМ в дозе 100 мкг/мл и повторное воздействие ФМ в дозе 300 мкг/мл (а) или 500 мкг/мл (б). Стрелки указывают на крупные переживающие клетки. Окраска по Май-Грюнвальду Гимзе. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Эффекты воздействия ионизирующего излучения на клетки глиобластом

После однократного облучения в дозе 10 Гр во всех клеточных линиях глиобластом сохранялись пролиферирующие клетки. Результаты влияния облучения на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом суммированы в Таблице 4.

Таблица 4 — Влияние облучения на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

Линия	Суммарная доза облучения с указанием разовой [в скобках], Гр			
	10	36 [2]	50 [2]	10 + 20*
A172	ПК (15)	ПК (18)	Гибель	Гибель
R1	ПК (22)	ПК (26)	Гибель	НО
T98G	ПК (8)	НО	ПК (13)	ПЖК
T2	ПК (26)	ПЖК	ПЖК	НО

Примечание. В скобках указано время (сут) от момента окончания облучения до достижения культурой 70%-ного конфлюэнта. * – Клетки после облучения в дозе 10 Гр по достижении 70%-ного конфлюэнта облучали повторно в дозе 20 Гр; ПК – пролиферирующие клетки, ПЖК – переживающие клетки, НО – не определяли.

В линиях T98G и T2 после облучения в разных режимах отмечались крупные одноклеточные и многоклеточные клетки (Рисунок 6). По реакции на действие облучения линии T98G и T2 отличались от A172 и R1. В отличие от A172 и R1, в которых после облучения в суммарной дозе 50 Гр все клетки погибали, в T2 отмечались крупные неопролиферирующие резистентные клетки, которые сохраняли жизнеспособность срок наблюдения 2 мес. Клетки

T98G после двукратного облучения (10+20 Гр) также не пролиферировали и сохраняли жизнеспособность более месяца (срок наблюдения).

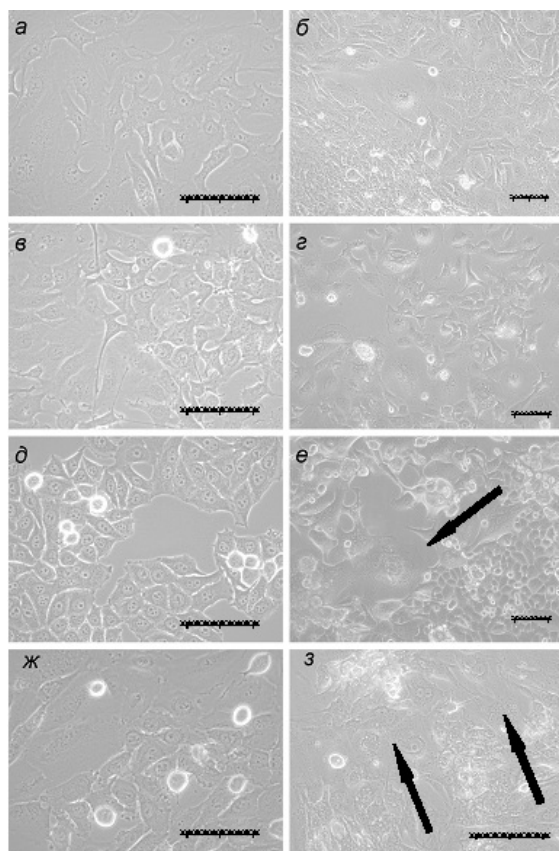


Рисунок 6 — Клетки линий A172 (а, б), R1 (в, г), T98G (д, е), T2 (ж, з): контроль (а, в, д, ж); после фракционированного облучения в суммарных дозах 36 Гр (б, г) и 50 Гр (е, з). Фазовый контраст. Стрелки указывают на многоядерные клетки. Масштабные отрезки: 100 мкм.

Экспрессия поверхностных маркеров на клетках глиобластом

Более 95% клеток линий глиобластом экспрессировали мезенхимные маркеры CD29, CD44, CD166. По экспрессии двух других мезенхимных маркеров – CD90 и CD105 линии различались между собой. Нейрональные маркеры CD56 и CD133/2 были обнаружены на клетках линий A172 и R1, в то время как на клетках T98G и T2 эти маркеры выявлены не были. Экспрессия эндотелиального маркера CD106 была отмечена только на небольшой доле клеток линии R1. Все клеточные линии характеризовались высокой экспрессией маркеров CD146, CD147, CD151. Маркеры с наиболее выраженными различиями в экспрессии представлены на Рисунке 7 а.

Определение поверхностных маркеров проводили на клетках A172 после действия ФМ в дозе 50 мкг/мл, клетках T98G, T2 и R1 – 100 мкг/мл, а также на клетках всех линий после облучения в дозе 10 Гр через 2 пассажа культивирования (Рисунок 7 б). Определение поверхностного фенотипа переживающих клеток проводили на линии T98G через 12 сут после действия ФМ в дозе 300 мкг/мл (Рисунок 7 в).

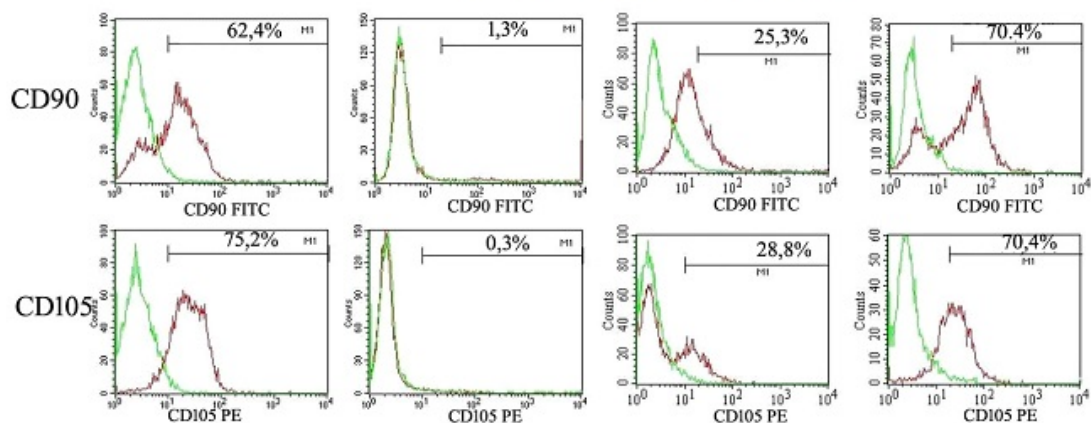
A172

T98G

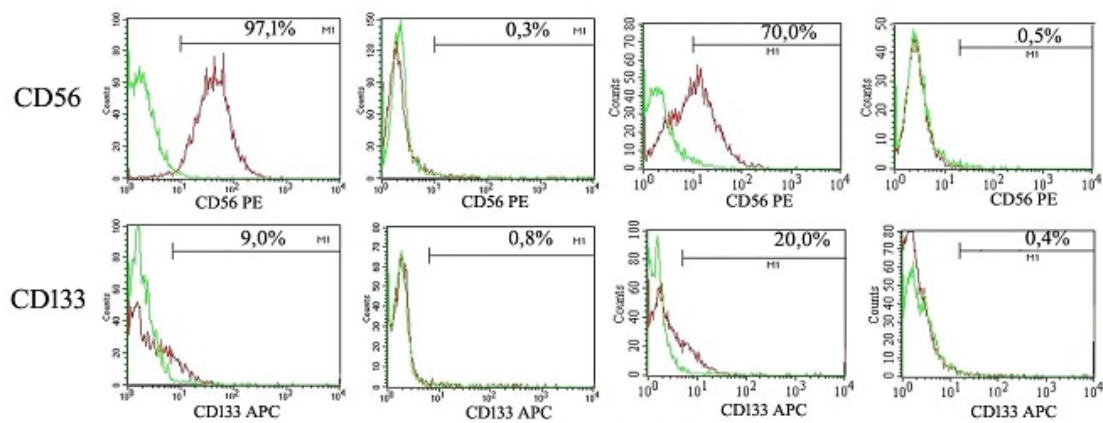
R1

T2

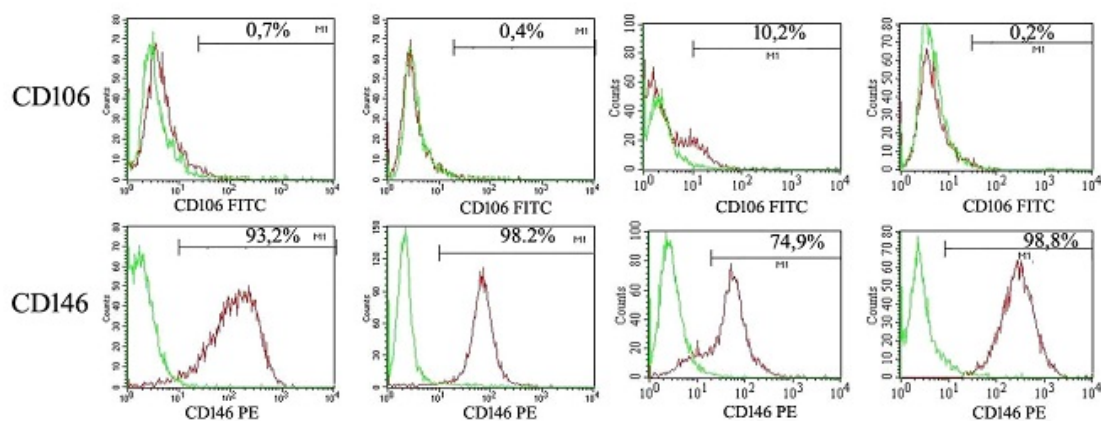
Мезенхимные маркеры



Нейрональные маркеры



Другие маркеры



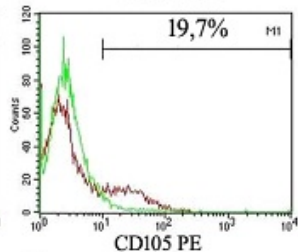
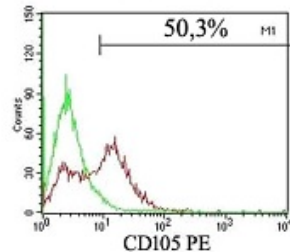
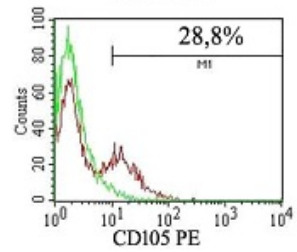
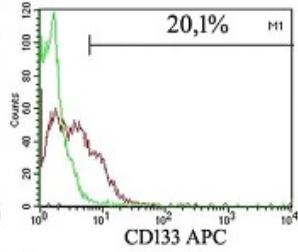
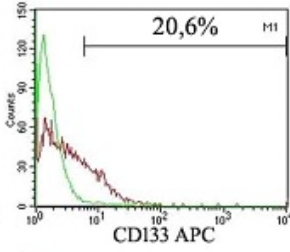
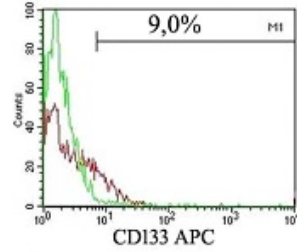
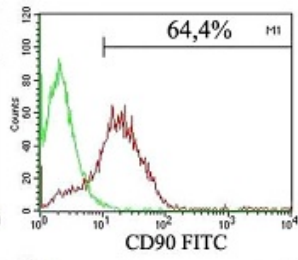
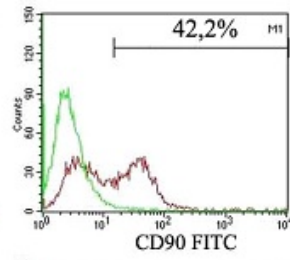
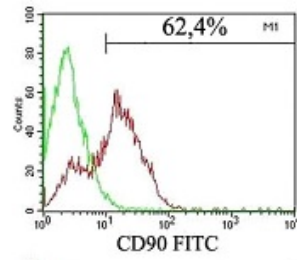
a

Интактные линии

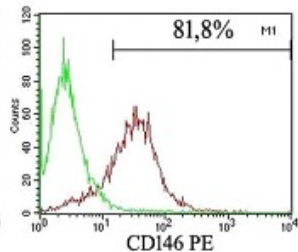
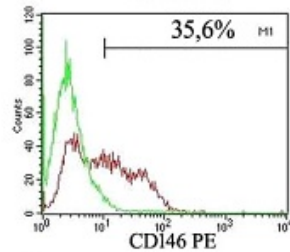
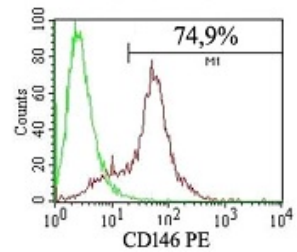
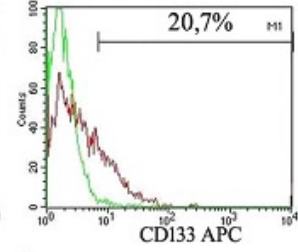
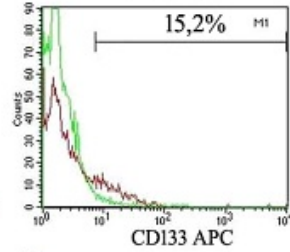
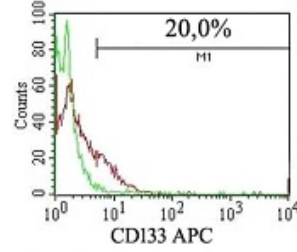
Действие ФМ

Облучение

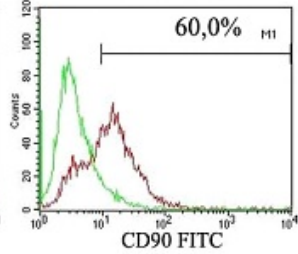
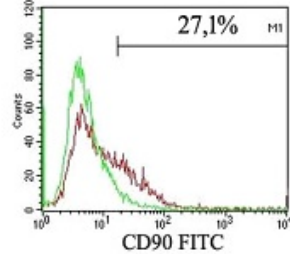
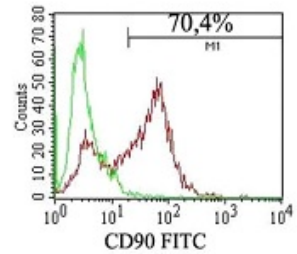
A172

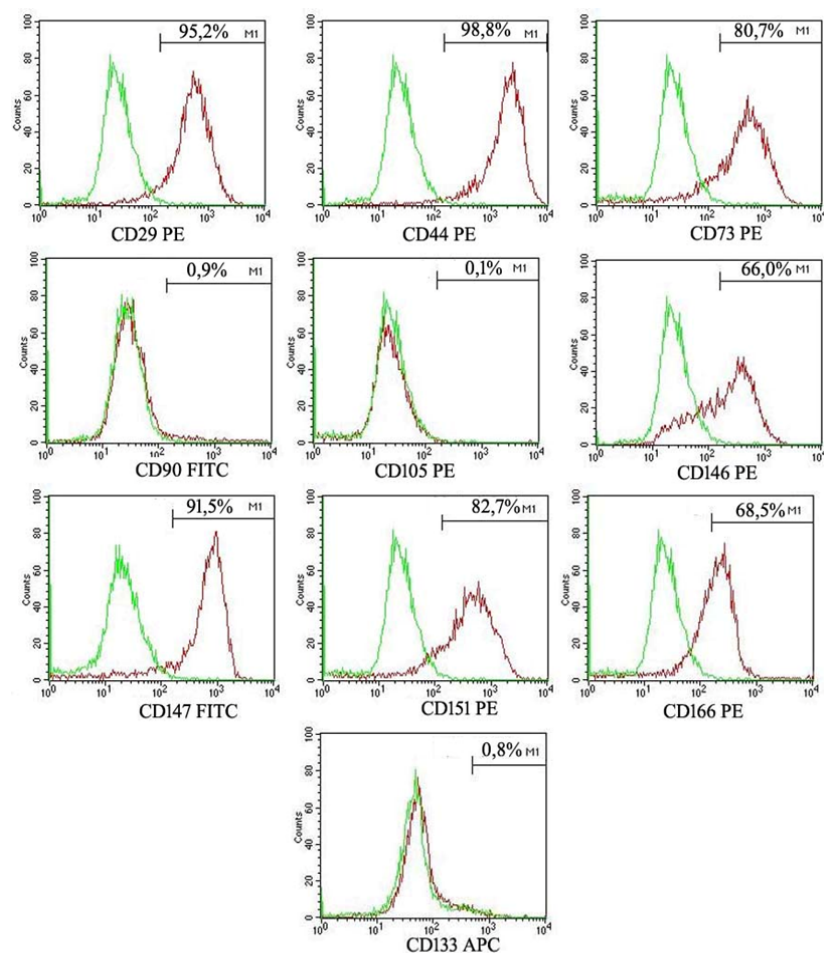


R1



T2





В

Рисунок 7 — Гистограммы распределения экспрессии поверхностных маркеров: а) интактных клеток линий A172, T98G, R1, T2; б) после действия сублетальных доз ФМ и облучения в дозе 10 Гр по сравнению с интактными клетками; в) переживающих клеток T98G после действия ФМ в дозе 300 мкг/мл. Иммуноцитофлуориметрический анализ. По горизонтали – интенсивность флуоресценции, по вертикали – число событий. Над каждой гистограммой указана доля позитивных клеток в % (среднее арифметическое). Порог отсека позитивных клеток указан отрезком M1. Зеленая линия – изотипический контроль.

Действие ФМ и облучения приводило к изменениям популяционного состава исследуемых линий. Как пролиферирующие, так и переживающие резистентные клетки, сохраняли высокую экспрессию мезенхимных маркеров, а также маркеров, связанных с инвазивной способностью клеток – CD147 и CD151. После действия ФМ отмечалось снижение доли пролиферирующих клеток, экспрессирующих CD90 в линиях A172 и T2, в которых CD90 исходно был представлен на большинстве клеток. В линии A172 было отмечено увеличение доли CD133 позитивных клеток как после действия ФМ, так и облучения. В линии R1 экспрессия CD133 отмечалась на популяциях клеток, не обладающих устойчивостью к действию ФМ. После действия препарата доля CD133 позитивных клеток была снижена. Влияние облучения в дозе 10 Гр на популяционный состав всех клеточных линий было менее выраженным, чем действие ФМ в сублетальных дозах.

Переживающие клетки T98G высоко экспрессировали маркеры CD44, CD73, CD147, CD151, многие из которых являются полифункциональными молекулами, участвующими в прогрессии глиобластом. В популяции переживающих клеток T98G, формирующихся после действия ФМ, отмечено снижение доли клеток, экспрессирующих CD146 и CD166, тем не менее экспрессия этих маркеров отмечалась на большей части переживающих клеток (Рисунок 7 в).

Исследование активности генов в клетках глиобластом

В клетках исследуемых линий была оценена экспрессия генов ростовых факторов *TGFβ1*, *VEGF*, *FGF2(b)*, *EGF*, *HGF*, генов белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения (*αSMA* и *FAP*), генов белков внеклеточного матрикса (*TNC* и *THBS1*), а также гена транскрипционного фактора *Zeb1*. Результаты сравнения активности генов в интактных клетках глиобластом представлены на Рисунке 8. В клетках A172 и R1 гены *FAP* и *TNC* имели более высокую активность, чем в клетках T98G и T2.

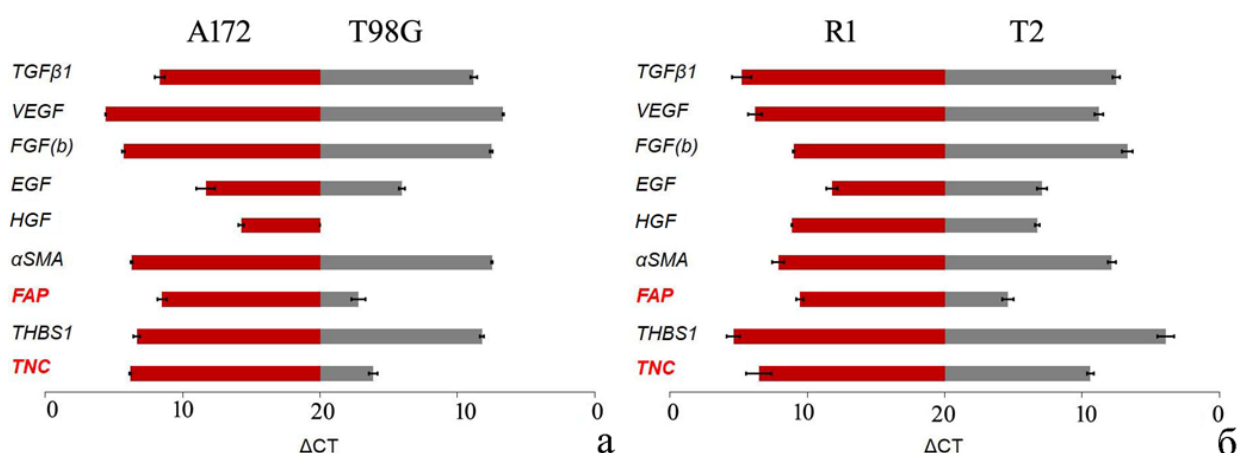


Рисунок 8 — Относительный уровень экспрессии генов в клетках линий: A172 и T98G (а), R1 и T2 (б). По горизонтали – уровни ΔСТ, по вертикали – названия генов. Горизонтальные отрезки – стандартное отклонение.

Клетки глиобластом, сохранявшие пролиферативную активность после действия ФМ или облучения в сублетальных дозах, исследовали после пересева и восстановления ими 70%-ного конфлюэнтного монослоя. При исследовании переживающих клеток мРНК выделяли через 21–30 сут после действия ФМ и через 30–40 сут после последнего сеанса облучения.

После действия ФМ в дозе 50 мкг/мл в линии A172 отмечалось снижение активности большинства исследованных генов, в R1 – снижение активности *EGF* и *HGF* (Рисунок 9 а). В клетках T98G и T2, наоборот, эффект действия ФМ в дозе 100 мкг/мл выражался в увеличении экспрессии генов (Рисунок 9 б). Действие ФМ в дозе 300 мкг/мл приводило к усилению

активности ряда генов в линиях T98G и T2. Наиболее выраженная активация была отмечена для генов *FAP* и *TNC*, а также *HGF* в линии T98G (Рисунок 9 в).

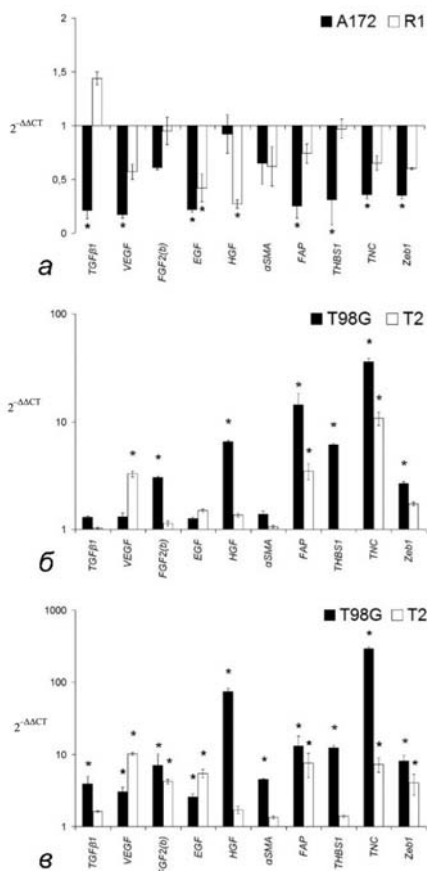


Рисунок 9 — Изменение экспрессии генов после действия ФМ в дозах: (а) 50 мкг/мл в клетках A172 и R1, (б) 100 мкг/мл в клетках T98G и T2, (в) 300 мкг/мл в клетках T98G и T2. По горизонтали – исследуемые гены, по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$. * – различие достоверно при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни), вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

В клетках линий A172 и R1 после облучения в дозе 10 Гр, активность большинства исследованных генов была в пределах значений, характерных для интактных клеток, а в клетках T98G и T2 проявляла тенденцию к увеличению (Рисунок 10 а, б). В линиях T98G и T2 возрастала экспрессия генов *FAP* и *Zeb1*, в T2 – *VEGF*, *TNC* (Рисунок 10 б).

Фракционированное облучение в дозе 36 Гр приводило к снижению активности гена *TNC* в линиях A172 и R1, а также генов *TGFβ1* и *HGF* в линии R1. В клетках A172 активность гена *αSMA* была увеличена (Рисунок 10 в).

После облучения в дозе 50 Гр в клетках T2 возрастал уровень экспрессии генов *VEGF*, *FGF(b)*, *EGF*, *FAP*, *TNC* и *Zeb1*, в линии T98G – генов *FGF(b)*, *EGF*, *HGF*, *FAP*, *THBS1*, *TNC*, *Zeb1* (Рисунок 10 г). После двукратного облучения в дозах 10 и 20 Гр в клетках T98G активность всех исследованных генов была повышена. Максимальная активация была отмечена для генов *HGF*, *FAP* и *TNC* (Рисунок 11 а). Таким образом, в переживающих клетках глиобластом T98G и T2 отмечалось многократное усиление активности генов факторов, связанных с прогрессией опухолей.

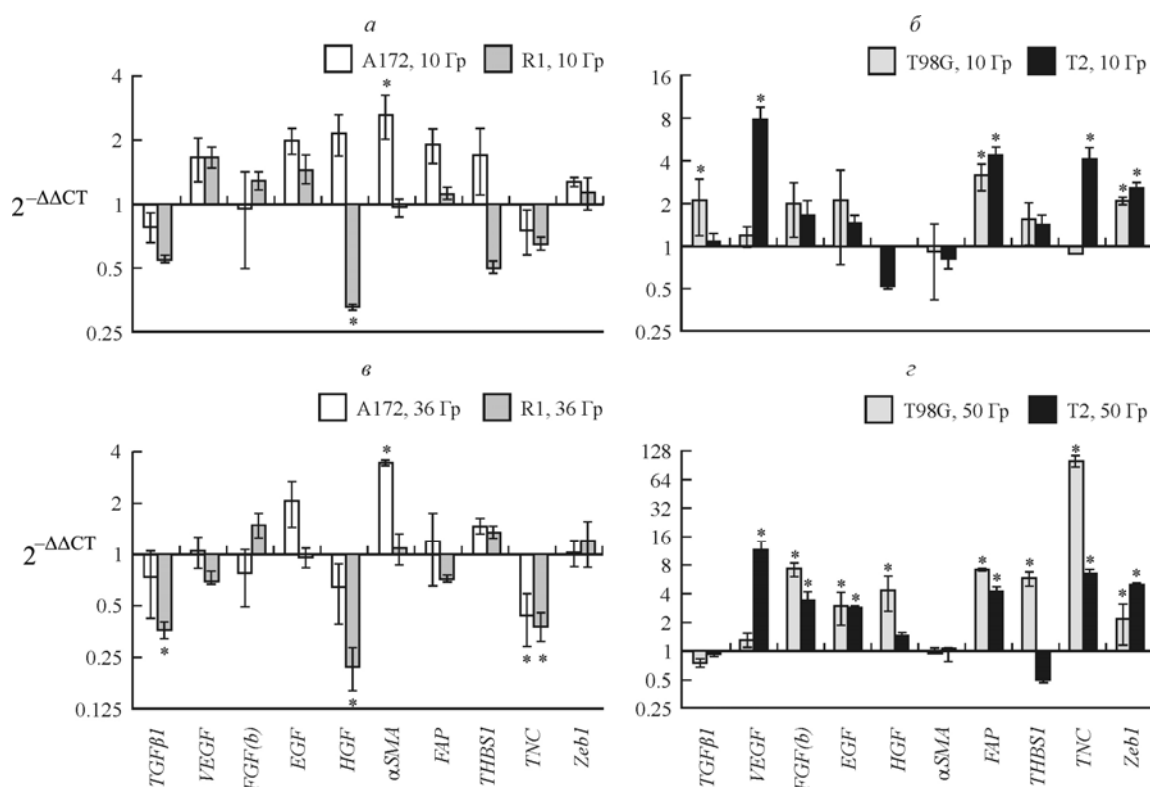


Рисунок 10 — Изменение экспрессии генов в клетках A172, R1 (а, в), T98G и T2 (б, г) после облучения в дозе 10 Гр (а, б), после фракционированного облучения в дозах 36 Гр (в) и 50 Гр (г). По горизонтали – исследуемые гены; по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$; * – различие достоверно при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни); вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

Сопоставление профилей активности исследованных генов в переживающих клетках T98G и T2 после действия ФМ с профилем активности тех же генов после действия облучения продемонстрировало их значительное совпадение (Рисунок 11 а, б).

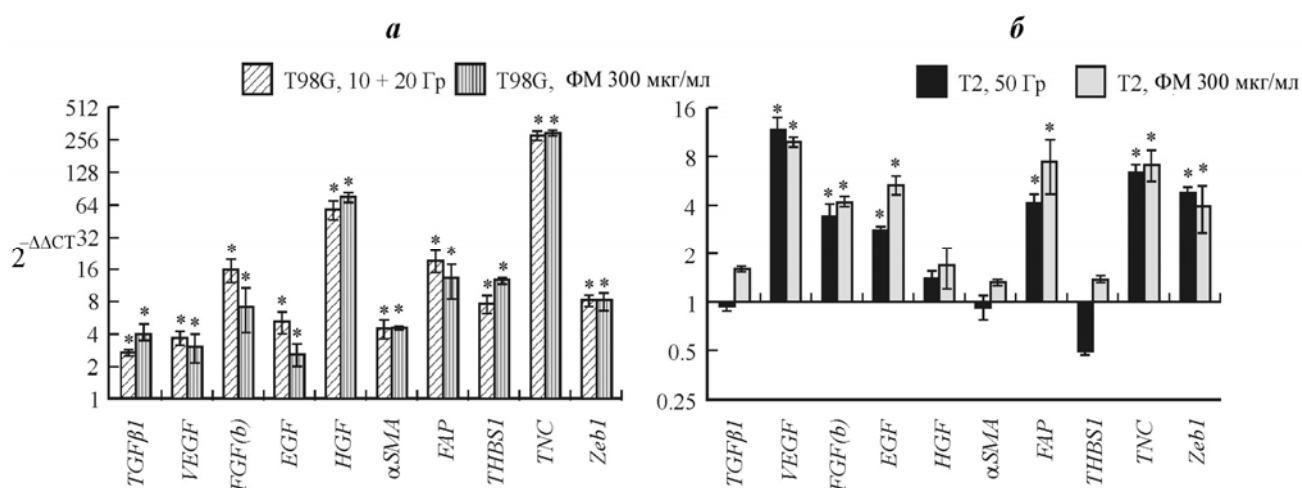


Рисунок 11 — Изменение экспрессии генов в клетках T98G (а) и T2 (б) после двукратного облучения 10+20 Гр (а), после фракционированного облучения в дозе 50 Гр (б), после действия ФМ в дозе 300 мкг/мл (а, б). По горизонтали – исследуемые гены; по вертикали – $2^{-\Delta\Delta CT}$; * – различие достоверно при $P \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни); вертикальные отрезки – стандартное отклонение.

ВЫВОДЫ

1. Клеточные линии глиобластом A172, T98G, T2 и R1 характеризовались морфологической и фенотипической гетерогенностью. Линии глиобластом A172 и R1, в отличие от линий T98G и T2, содержали популяции клеток, несущих нейрональные маркеры CD56 и CD133/2.

2. Выделено два типа реагирования клеточных линий глиобластом на действие генотоксических факторов. Действие облучения или фотемустина в высоких дозах (50 Гр, 300 мкг/мл) вызывало гибель клеточных культур A172 и R1, в то время как линии T98G и T2 были устойчивы к этим воздействиям за счет появления крупных одноядерных и многоядерных клеток (переживающих клеток), которые сохраняли жизнеспособность в течение всего периода наблюдений (1,5–2 мес после воздействия).

3. Действие облучения или фотемустина в сублетальных дозах (36 Гр, 50 мкг/мл) на линии A172 и R1 приводило к снижению экспрессии ряда генов. Снижение экспрессии было наиболее выражено для генов гепатоцитарного ростового фактора (*HGF*), тенасцина С (*TNC*) и трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (*TGF\beta 1*).

4. Переживающие клетки линий T98G и T2 характеризовались усилением активности генов ряда факторов, влияющих на прогрессию опухолей. Наиболее выраженное увеличение активности отмечено для генов гепатоцитарного ростового фактора (*HGF*), белка внеклеточного матрикса тенасцина С (*TNC*) и белка активированных фибробластов (*FAP*).

5. Активность генов факторов, влияющих на прогрессию опухолей (тенасцина С (*TNC*), эпидермального ростового фактора (*EGF*), основного фактора роста фибробластов 2 (*FGF2(b)*), фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*)), в переживающих клетках линий T98G и T2 после действия фотемустина в значительной степени совпадала с активностью этих генов после облучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Киселева, Л.Н.** Характеристика клеточных линий A172 и T98G / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, А.А. Пиневиц, М.П. Самойлович //Цитология. –2016. –Т.58, №5. – С.349–355. (Scopus)

2. **Киселева, Л.Н.** Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, А.А. Пиневиц, М.В. Филатов, М.П. Самойлович //Цитология. – 2017. – Т. 59, №10. – Р.669–675. (Scopus)

3. **Киселева, Л.Н.** Действие фотемустина на клетки линий глиобластом человека / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, А.А. Пиневиц, М.П. Самойлович // Цитология. – 2018. – Т.60, №1. – С.21–29. (Scopus)

4. **Киселева, Л.Н.** Резистентные к действию генотоксических факторов многоядерные клетки в культивируемых линиях глиобластом человека / Киселева Л.Н., Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, А.А. Пиневиц, М.П. Самойлович // Цитология. – 2018. – Т.60, №8. – С.616–622. (Scopus)

Тезисы докладов:

1. Киселева, Л.Н. Фенотип и чувствительность к фотемустину культивируемых клеточных линий глиобластом человека / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, М.П. Самойлович // Тезисы докладов 10-й конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения». – 2014. – С.44.

2. Киселева, Л.Н. Оценка позднего эффекта воздействия фотемустина на экспериментальную клеточную модель глиобластомы / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, М.П. Самойлович // Материалы I Российского онкологического научно-образовательного форума «Белые ночи». – 2015. – С.451–452.

3. Киселева, Л.Н. Оценка позднего эффекта воздействия фотемустина на клетки глиобластомы Т98G / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, М.П. Самойлович // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т.2, №4. – С.70–71.

4. Киселева, Л.Н. Оценка влияния облучения на клетки постоянных и первичных линий глиобластом / Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян, М.В. Филатов, М.П. Самойлович // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т.3, №4. – С.115–116.

5. Боде, И.И. Влияние фотемустина на жизнеспособность клеток глиобластомы линии Т2 / И.И. Боде, Л.Н. Киселева, Н.Л. Вартанян, М.П. Самойлович // Тезисы VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020». – 2020. – С.166.