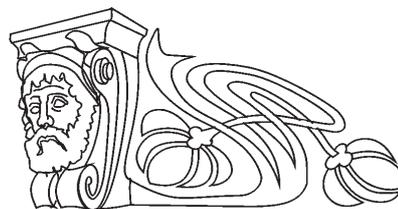




УДК 616-006.484

РАЗВИТИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГЛИОМЫ У КРЫС В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ БЕТА2-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ

А. П. Хороводов, А. А. Широков, Н. А. Новолокин, А. В. Терсков,
Э. А. Лаубертс, А. Т. Мамедова, Н. А. Шушунова, И. М. Агранович,
М. В. Уланова, А. А. Бодрова, О. В. Семячкина-Глушковская



Хороводов Александр Петрович, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, khorovodov2012@yandex.ru

Широков Александр Александрович, кандидат биологических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov_a@ibppm.ru

Новолокин Никита Александрович, аспирант кафедры патологической анатомии, ассистент кафедры патологической анатомии, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, nik-navolokin@yandex.ru

Терсков Андрей Витальевич, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terskow.andrey@gmail.com

Лаубертс Эльза Артемовна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, laubertselza@gmail.com

Мамедова Айсел Тофик-Кызы, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mamedovaysel95@gmail.ru

Шушунова Наталья Александровна, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, shushunovan.a@gmail.com

Агранович Илана Михайловна, аспирант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilana.agranovich@yandex.ru

Уланова Мария Васильевна, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, maru-ulanova@mail.ru

Бодрова Анастасия Алексеевна, магистрант биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, nastya1535@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

В данном исследовании показана роль адренергических механизмов в развитии флуоресцентной глиомы у крыс и связанное с этим нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Результаты показали, что прогрессирование глиомы сопровождалось постепенным повышением проницаемости ГЭБ на фоне увеличения экспрессии бета2-адренорецепторов (Б2-АР). Фармакологическая блокада Б2-АР уменьшала степень нарушения ГЭБ, миграцию раковых клеток и увеличивала продолжительность жизни животных. Наши данные подтверждают идею о том, что блокада Б2-АР может быть новой терапевтической стратегией для лечения глиомы и предотвращения метастазов.

Ключевые слова: глиома, ГЭБ, бета2-адренорецепторы.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-446-450>

Введение

Глиомы являются летальными формами опухолей головного мозга, которые составляют примерно 30% всех новообразований [1].

Средняя продолжительность жизни пациентов с момента постановки диагноза составляет всего 15 месяцев, менее 5% пациентов живут дольше 5 лет из-за 80% рецидива агрессивной глиомы [2,3]. Высокая частота рецидивов, плохая реакция на лечение и низкие показатели продолжительности жизни делают злокачественную глиому наиболее опасным новообразованием.

Глиома быстро распространяется и может колонизировать весь мозг, так как опухолевые инвазивные клетки довольно быстро распространяются далеко за пределами основной массы опухоли [4]. Образование глиомы характеризуется высокой плотностью микрососудов, в которых выявляется масса дефектов, аномальная морфология и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [4,5]. Несмотря на многочисленные исследования формирования и прогрессирования глиомы, состояние ГЭБ на фоне развития опухоли остается малоизученным.

В последнее десятилетие стало очевидным, что связанная со стрессом активация симпатической нервной системы (СНС) играет важную роль в развитии опухоли и регуляции микрососудов мозга [6, 7]. Клинические исследования показывают, что глиома часто ассоциируется с высоким уровнем катехоламинов, а блокада бета 2-адренорецепторов (Б2-АР) улучшает результаты



лечения больных раком [8, 9]. Вовлечение B2-AP и бета-аррестина-1 как ко-фактора сигнальной трансмембранной передачи нервного импульса в развитие различных форм онкологии показано во многих исследованиях [10, 11]. Однако роль СНС и, в частности, B2-AP в механизмах, ответственных за прогрессирование глиомы, остается плохо изученной и требует дальнейших исследований. Для лучшего понимания адренергических механизмов, лежащих в основе развития глиомы, в данной работе исследовали эффекты фармакологической модуляции B2-AP на развитие и миграцию флуоресцентной глиомы у крыс.

Материалы и методы

Объекты исследования

Эксперименты проводились на самцах белых беспородных крыс массой 250 г. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и эксплуатации лабораторных животных». Протокол эксперимента одобрен Комитетом по уходу и эксплуатации лабораторных животных Саратовского государственного университета (протокол № 7, 07.02.2018).

Группы животных

Экспериментальные животные были разделены на три группы:

1) крысы с глиомой (контроль), которые получали физиологический раствор в том же объеме, что препараты, модулирующие активность B2-AP;

2) крысы с глиомой, которым вводили изопротеренол (агонист B2-AP, 25 мг / кг / день, per os, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США);

3) крысы с глиомой, которым вводили ICI-118551 (специфический антагонист B2-AP, 25 мг / кг / день, per os, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Крысам вводили препараты в течение всех дней после имплантации раковых клеток.

Три указанные группы были разделены на 4 подгруппы: через 3–7 – 10–28 дней после имплантации раковых клеток для конфокальной визуализации и гистологического анализа тканей головного мозга. Каждая подгруппа включала 10 животных.

Время жизни животных оценивали у 10 крыс из трех основных групп (контроль, ICI-118551 и изопротеренол), в этих группах крысы жили до смерти.

Получение клеточной культуры флуоресцентной глиомы

Клетки C6 культивировали в среде DMEM (Paneco, Россия), содержащей 2,5% эмбриональной сыворотки теленка (Biosera), глутамина 4 мм (Paneco, Россия), пенициллина (50 МЕ/мл)

и стрептомицина (50 мг/мл) (Paneco, Россия). Для удаления клеток с поверхности чашки Петри использовали раствор Versene (Paneko, Россия) с добавлением 0,25% трипсина (Gibco). Клетки культивировали в инкубаторе CO₂ при 37°C с содержанием 5% CO₂.

Для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих белок TagRFP, клетки C6, трансфицировали лентивирусами LVTTagRFP (Evrogen, cat. LP001) в случае множественности заражения 10 вирусных частиц на клетку. Полученные клеточные линии выращивали до количества не менее 106 клеток и замораживали в среде для роста DMEM, содержащей 45% эмбриональной сыворотки теленка и 10% ДМСО. Экспрессия соответствующих флуоресцентных белков в полученных клеточных линиях была подтверждена флуоресцентной микроскопией на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Методы оценки проницаемости ГЭБ

Использовали метод конфокальной визуализации экстравазации FITC-декстран 70 кДа (40 мг / 250 г, 0,5% раствор в 0,9% физиологическом растворе, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Время циркуляции в кровотоке составляло 2 мин. Затем крыс декапетировали, их мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 ч в соответствии с протоколом, представленным в публикации [12]. Далее делали срезы тканей мозга толщиной 50 мкм на вибротоме (Leica VT 1000S Microsystem, Германия) и анализировали на конфокальном микроскопе (Leica TCS SP8, Leica, Germany). Исследовали 8–12 срезов с каждого мозга.

Гистологический анализ тканей и сосудов мозга

Мозг извлекали и помещали на сутки в забуференный формалин 10%. Готовили образцы тканей мозга толщиной 4–5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Результаты оценивали с помощью световой микроскопии с использованием системы цифрового анализа изображений MikroVizor medical mVizo-103 (ЛОМО, Россия).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы анализировали эффекты фармакологической блокады и стимуляции B2-AP на развитие глиомы и выживаемость животных с использованием конфокальной визуализации, гистологического анализа и определения времени смерти у крыс.

Рис. 1, а показывает флуоресцентную глиому через 28 дней после имплантации раковых клеток у крыс из первой группы, т.е. тех животных, у которых опухоль развивалась без фармакологи-

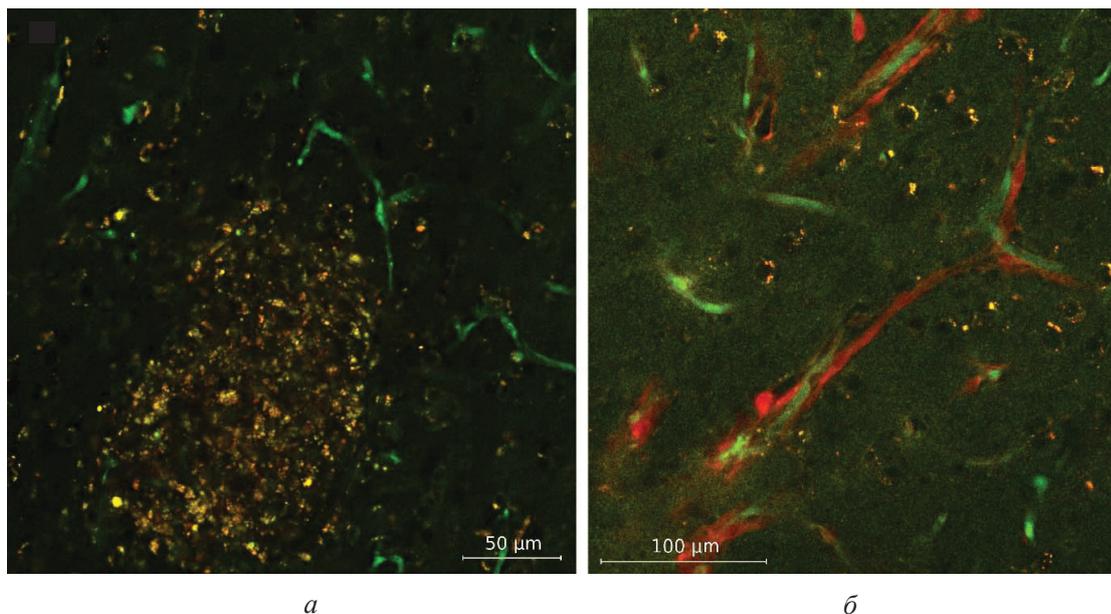


Рис. 1. Анализ прогрессии глиомы без (а) и с (б) фармакологической стимуляцией бета2-адренорецепторов: а – конфокальная визуализация флуоресцентной глиомы (желтый цвет за счет слияния красного и зеленого цветов, что объясняется высокой проницаемостью ГЭБ. Зеленый FITC-декстран выходит из церебральных сосудов и наблюдается между красными клетками глиомы. За счет этого отмечается слияние цветов) через 28 дней после имплантации раковых клеток; зеленый цвет – церебральные сосуды, заполненные FITC-декстраном 70 кДа; б – миграция глиомных клеток (красный цвет) по сосудам (зеленый цвет) головного мозга

ческих влияний. Гистологический анализ тканей мозга в этой группе показал клеточный полиморфизм, т.е. клетки разного размера и формы, что является типичным признаком глиомы (рис. 2). Без фармакологического воздействия метастазы наблюдались у 40% (4 из 10) крыс в период между 10-м и 28-м днем после имплантации глиомных клеток (см. рис. 2). Животные умирали через 28–35 дней после начала роста глиомы.

У всех крыс (10 из 10), которым вводили изопротеренол (агонист Б2-АР), были обнаружены метастазы через 7 дней после имплантации раковых клеток, которые мигрировали вдоль сосудов головного мозга (см. рис. 1, б). Животные умирали между 18–22-м днями после имплантации раковых клеток, то есть продолжительность жизни в этой группе была ниже в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой.

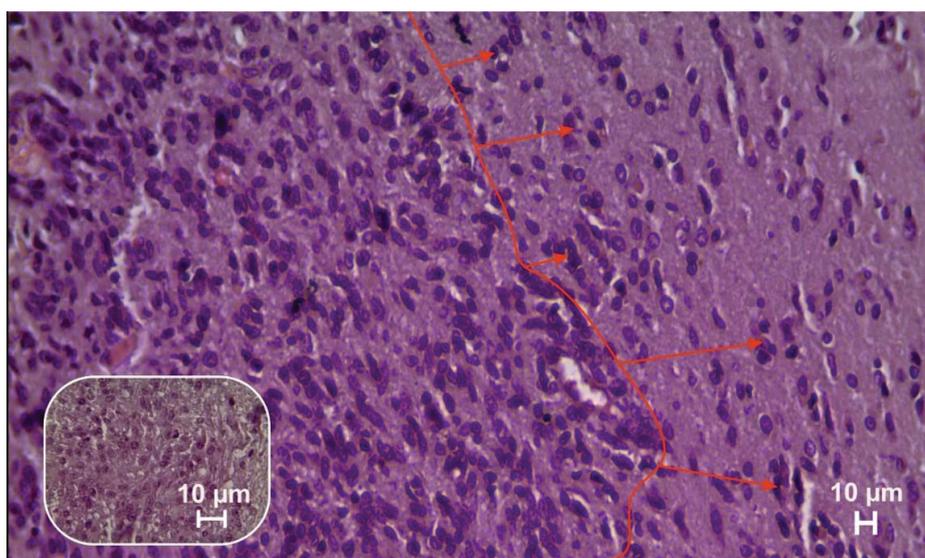


Рис. 2. Гистологический анализ тканей головного мозга крысы с глиомой



Блокада Б2-АР уменьшала миграцию раковых клеток. В этой группе только у 20% крыс (2 из 10) отмечались метастазы. Продолжительность жизни животных была увеличена до 43–47 дней после начала развития глиомы, что в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой.

Заключение

Блокада Б2-АР ICI-118551 уменьшает миграцию глиомных клеток и увеличивает продолжительность жизни крыс. Стимуляция Б2-АР изопротеренолом вызывает противоположные эффекты, т.е. сопровождается ранней миграцией опухолевых клеток, и уменьшает срок жизни животных. Результаты, полученные в ходе исследования, подтверждают возможность создания новой терапевтической стратегии терапии глиомы, а именно блокады Б2-АР.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-75-20069).

Список литературы

1. Wöhrer A., Waldhör T., Heinzl H., Hackl M., Feichtinger J., Gruber-Mösenbacher. The Austrian Brain Tumour Registry : a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry // J. of Neuro-Oncology. 2009. Vol. 95, № 3. P. 401–411.
2. Jovčevska I., Kočevar N., Komel R. Glioma and glioblastoma-how much do we (not) know? // Molec. and Clin. Oncology. 2013. Vol. 1, № 6. P. 935–941.
3. Li R., Chen X., You Y., Wang X., Liu Y., Hu Q., Yan W. Comprehensive portrait of recurrent glioblastoma multiforme in molecular and clinical characteristics // Oncotarget. 2015. Vol. 6, № 31. P. 30968.
4. Watkins S., Robel S., Kimbrough I. F., Robert S. M., Ellis-Davies G., Sontheimer H. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells // Nature Commun. 2014. Vol. 5. P. 4196.
5. Dvorak H. F. How tumors make bad blood vessels and stroma // The Amer. J. of Pathology. 2003. Vol. 162, № 6. P. 1747.
6. Cole S. W., Nagaraja A. S., Lutgendorf S. K., Green P. A., Sood A. K. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment // Nat. Rev. Cancer. 2015. Vol. 15, № 9. P. 563.
7. Qiao G., Chen M., Bucsek M. J., Repasky E. A., Hylan-der B. L. Adrenergic signaling : a targetable checkpoint limiting development of the anti-tumor immune response // Frontiers in Immunology. 2018. Vol. 9. P. 164.
8. Eldeeb B. B., Hammond E. M., Worthington D. J., Mann J. R. Urinary catecholamines and their metabolites in management of neuroblastoma // Pediatric Hematology and Oncology. 1988. Vol. 5, № 3. P. 229–237.
9. De Giorgi V., Grazzini M., Gandini S., Benemei S., Lotti T., Marchionni N., Geppetti P. Treatment with β -blockers and reduced disease progression in patients with thick melanoma // Arch. of Internal Med. 2011. Vol. 171, № 8. P. 779–781.
10. 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 // Cancer Manag. and Res. 2012. Vol. 4. P. 431.
11. Song Q., Ji Q., Li Q. The role and mechanism of β -arrestins in cancer invasion and metastasis // Intern. J. of Molecular Med. 2018. Vol. 41, № 2. P. 631–639.
12. Hoffmann A., Bredno J., Wendland M., Derugin N., Ohara P., Wintermark M. High and Low molecular weight fluorescein Isothiocyanate (FITC)-dextrans to assess blood-brain barrier disruption : Technical considerations // Transl. Stroke Res. 2011. Vol. 2, № 1. P. 106–111.

Development of Fluorescent Glioma in Rats under Pharmacological Modulation of Beta2-Adrenergic Receptor

A. P. Khorovodov, A. A. Shirokov, N. A. Novolokin, A. V. Terskov, E. A. Lauberts, A. T. Mamedova, N. A. Shushunova, I. M. Agranovich, M. V. Ulanova, A. A. Bodrova, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Aleksandr P. Khorovodov, <https://orcid.org/0000-0002-5318-5200>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, khorovodov2012@yandex.ru

Aleksandr A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-3239-7877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPFM RAS), 13, Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru

Nikita A. Novolokin, <https://orcid.org/0000-0001-7876-9758>, Saratov State Medical Universit, 112, Bolshaya Kazachya Str., 410010 Russia, nik-navolokin@yandex.ru

Andrey V. Terskov, <https://orcid.org/0000-0003-1111-9990>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, terskov.andrey@gmail.com

Elza A. Lauberts, <https://orcid.org/0000-0003-3794-9677>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, laubertselza@gmail.com

Aysel T. Mamedova, <https://orcid.org/0000-0002-0229-0801>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, mamedovaysel95@gmail.ru

Natalia A. Shushunova, <https://orcid.org/0000-0001-5366-1783>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shushunovan.a@gmail.com

Ilana M. Agranovich, <https://orcid.org/0000-0002-7903-3897>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, ilana.agranovich@yandex.ru



Maria V. Ulanova, <https://orcid.org/0000-0002-6516-1687>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, maru-ulanova@mail.ru

Anastasia A. Bodrova, <https://orcid.org/0000-0002-0300-7481>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, nastya1535@mail.ru

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

This study shows the role of adrenergic mechanisms in the development of fluorescent glioma in rats and the impairment of the

blood-brain barrier (BBB) permeability. The results demonstrate that the progression of glioma was accompanied by a gradual increase in the BBB permeability and an increased expression of vascular beta2-adrenoreceptors (B2-AR). The pharmacological blockade of B2-AR reduced the degree of BBB disruption, the migration of cancer cells and increased the survival of animals. Our data support the idea that blockade of B2-AR may be a new therapeutic strategy for the treatment of glioma and the prevention of metastases.

Key words: glioma, BBB, beta2-adrenoreceptors.

Acknowledgements: *This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-75-20069).*

Образец для цитирования:

Хороводов А. П., Широков А. А., Новолокин Н. А., Терсков А. В., Лаубертс Э. А., Мамедова А. Т., Шушунова Н. А., Агранович И. М., Уланова М. В., Бодрова А. А., Семьячкина-Глушковская О. В. Развитие флуоресцентной глиомы у крыс в условиях фармакологической модуляции бета2-адренорецепторов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 446–450. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-446-450>

Cite this article as:

Khorovodov A. P., Shirokov A. A., Novolokin N. A., Terskov A. V., Lauberts E. A., Mamedova A. T., Shushunova N. A., Agranovich I. M., Ulanova M. V., Bodrova A. A., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Development of Fluorescent Glioma in Rats under Pharmacological Modulation of Beta2-Adrenergic Receptor. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 446–450 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-446-450>
