

## ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНАЦИЙ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ С ХИМИОПРЕПАРАТАМИ НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ И НЕЙРОГЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

А. Н. Чернов

*Институт физиологии НАН Беларуси*

Поступила в редакцию 28.04.2016 г.

**Аннотация.** На первичных культурах клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы, медуллобластомы и нейроглиальной ткани мозга изучена цитотоксическая эффективность фактора роста нервов (ФРН) и его комбинаций с химиопрепаратами (винкристином, карбоплатином, метотрексатом, темозоломидом, циклофосфамидом, цисплатином, цитарабином и этопозидом). Установлено, что комбинация ФРН с химиопрепаратами на культурах опухолей оказывает равное с химиопрепаратами цитотоксическое действие или усиливает его, тогда как на культурах клеток нейроглиальной ткани комбинация реагентов проявляет более слабый цитотоксический эффект по сравнению с химиопрепаратами и ФРН.

**Ключевые слова:** культура клеток, пилоцитарная, анапластическая астроцитомы, глиобластома, медуллобластома, фактор роста нервов, комбинация фактора роста нервов с химиопрепаратами, нейроглиальная ткань, индекс цитотоксичности

**Abstract.** The cytotoxic efficacy of nerve growth factor (NGF) and its combination with chemotherapy (vincristine, carboplatin, methotrexate, temozolomide, cyclophosphamide, cisplatin, cytarabine and etoposide) was studied on the pilocytic astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, medulloblastoma, and neuroglial brain tissue primary cell cultures. It was found that the combination of NGF with chemotherapy is equal or enhances the cytotoxic effect of chemotherapy on the tumor's cell cultures, while the combination of reactants exhibits a weak cytotoxic effect compared to chemotherapy and NGF on the neuroglial tissue cell cultures.

**Keywords:** cell culture, pilocytic, anaplastic astrocytomas, glioblastoma, medulloblastoma, nerve growth factor, combination of the nerve growth factor and chemotherapeutic drugs, neuroglial tissue, index of cytotoxicity.

В настоящее время онкологические заболевания по распространенности, социально-экономическому снижению качества жизни и смертности вышли на второе место вслед за патологией сердечно-сосудистой системы [1].

По материалам Всемирной организации здравоохранения и Международного агентства изучения рака – Globocan в мире в 2012 г. зарегистрировано 21636 детей (0–14 лет), страдающих опухолями мозга и 12488 (57.7%) погибших в результате данной патологии [2]. У детей и под-

ростков мозговые новообразования по распространенности занимают второе место, уступая только лейкозам [3]. Мозговые опухоли являются гетерогенной группой, включающей как высокозлокачественные, так и низкокзлокачественные гистологические типы. К наиболее частым детским злокачественным интракраниальным опухолям относятся медуллобластома, нейробластома, к доброкачественным – эпендимомы и пилоцитарная астроцитома [4]. Например, частота распространения медуллобластомы в мире у пациентов младше 15-летнего возраста составляет 25% от всех опухолей ЦНС [5].

Средняя продолжительность жизни пациентов с злокачественными глиальными опухолями составляет при консервативном лечении – 14 недель, при хирургической резекции, сочетаемой с радиотерапией – 36, при дополнении химиотерапией – 40–50 недель [6]. Вследствие существующей опасности повреждения жизненно важных центров или диффузным характером роста интракраниальных опухолей, их оперативное вмешательство не всегда возможно, что делает актуальным совершенствование методов лучевой и химиотерапии.

Основным негативным моментом, ограничивающим применение химиотерапии, является губительное цитотоксическое воздействие на нормальные, окружающие опухоль, клетки мозга. В связи с этим актуален поиск новых фармакологических веществ, обладающих противоопухолевой активностью [7]. Для внедрения в клиническую практику нового лекарственного средства необходимо проведение доклинических испытаний [7]. Начальный этап этих исследований включает скрининг лекарственных веществ на противоопухолевую активность с применением моделей *in vitro*, в качестве которых в биологии, фармакологии и медицине используют культуры клеток человека и животных. Скрининг лекарственных средств *in vitro* позволяет выявить «кандидаты» – вещества, предназначенные для дальнейшего тестирования *in vivo*, сократить объем исследования и сроки экспериментов. В качестве таких потенциальных кандидатов в онкологии могут рассматриваться эндогенные регуляторные белки – ростовые факторы или их комбинации с химиопрепаратами.

К настоящему времени описано более восьмидесяти ростовых факторов [8]. Самым первым и хорошо изученным из них является фактор роста нервов – ФРН [9, 10]. Уникальность его заключается в различном влиянии на нормальные и опухолевые клетки [9]. Фактор роста нервов способствует выживаемости, поддержанию и дифференцировке симпатических холинэргических нейронов, глиальных клеток. В то же время он вызывает ингибирование ангиогенеза, инвазии опухолей [11]. Не изученным остается характер воздействия ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами на культуры клеток мозговых опухолей у детей и нормальной нейроглиальной ткани головного мозга.

Цель исследования – оценить цитотоксическое воздействие комбинаций фактора роста нервов с химиопрепаратами в десятикратно снижен-

ной концентрации в сравнении с обособленным применением фактора роста нервов на культурах клеток интракраниальных неоплазий и нейроглиальной ткани человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Пациенты.* Исследование выполнено на первичных культурах клеток, полученных из фрагментов интракраниальных опухолей, взятых для гистологического исследования (с информированного согласия родителей) у 60 пациентов в возрасте от 3 мес до 17 лет (медиана возраста  $8.3 \pm 0.6$  года), находившихся на лечении в Городской клинической больнице скорой медицинской помощи г. Минска в 2008–2013 гг. (договор о научном сотрудничестве от 21.11.2008 г.). В исследование также включены 10 скоропостижно умерших (по причине не связанной с травмами или заболеваниями головного мозга) человек в 2009 г., у которых во время вскрытия в морге Управления судебно-медицинских экспертиз Государственного комитета судебно-медицинских экспертиз Республики Беларусь по Минской области была взята нейроглиальная ткань.

С целью формирования клинически относительно однородных групп пациентов из историй болезней брали сведения о гистологическом типе опухоли, степени ее злокачественности, радикальности хирургического вмешательства, локализации ее в отделах головного мозга, а также о возрасте и поле пациентов. Они позволили сформировать пять исследовательских групп. В первую группу вошли 22 пациента с низкоклеточной глиальной опухолью – пилоцитарной астроцитомой (GrI, 13 мальчиков и 9 девочек, медиана возраста –  $7.9 \pm 0.7$  года,  $n=22$ ). Вторая группа включала 8 пациентов с анапластической астроцитомой (GrIII, 5 мальчиков и 3 девочки, медиана возраста  $8.6 \pm 1.6$  года,  $n=8$ ). Третья группа включала 8 пациентов с глиобластомой (GrIV, 8 мальчиков, медиана возраста  $10.3 \pm 1.9$  года,  $n=8$ ). Четвертая группа состояла из 22 детей с эмбриональной опухолью – медуллобластомой (GrIV, 16 мальчиков и 6 девочек, средний возраст  $5.7 \pm 0.6$  года,  $n=22$ ). В пятую группу вошли 10 скоропостижно умерших человек, у которых во время вскрытия были взяты фрагменты мозга (8 мужчин и 2 женщины, медиана возраста  $57.1 \pm 4.0$  лет,  $n=10$ ).

*Первичная культура клеток.* Поступавший из клиники в течение 1 ч, материал в стерильных условиях ламинарного бокса (Lobconco, США)

отмывали от крови, освобождали от соединительнотканых элементов в растворе Хэнкса (Sigma-Aldrich, США), содержащим 4%-ный сульфат гентамицина (Белмедпрепараты, РБ) и механически измельчали до мелких частиц. Клетки подвергали 10 мин ферментативной обработке смесью 0.25%-го раствора трипсина и 0.02%-го ЭДТА в соотношении 1:3 (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С. Действие фермента нейтрализовали внесением в чашки Петри с посевами 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Обработанный материал подсчитывали в камере Горяева и переносили в количестве 500 тыс. клеток/мл в чашки Петри (d=35 мм, Nunc, Дания) с 1 мл среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки нейроглиальной ткани выделяли из мозжечка скоропостижно умерших (по причине не связанной с травмами или заболеваниями головного мозга) людей в течение 24 ч с момента смерти [12]. В стерильных условиях ламинара (Lobconco, США) фрагменты ткани трехкратно промывали в растворе Хэнкса (Sigma-Aldrich, США) с десятикратным содержанием 4%-го сульфата гентамицина (Белмедпрепараты, РБ), стрептомицина (Киевмедпрепарат, Украина) 100 мкг/мл, натриевой соли пенициллина G (Biochemie, Австрия) 100 ед/мл в течение 30 мин, механически очищали от видимых кровеносных сосудов и измельчали до мелких частиц. Последние экспонировали со смесью 0.25%-го раствора трипсина и 0,02%-го ЭДТА в соотношении 1:3 (Sigma-Aldrich, США) на протяжении 20 мин при 37°С и обрабатывали ДНКазой (Sigma-Aldrich, США) 20 мкг/мл при 37°С в течение 25 мин. Действие ферментов останавливали, добавляя в чашки с культурой фетальную телячью сыворотку. Обработанный материал центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин и усиленно пипетировали перед посевом на чашки Петри. Клетки подсчитывали в камере Горяева и переносили в количестве 500 тыс. клеток/мл в чашки Петри (d=35 мм, Nunc, Дания) с 1 мл среды DMEM (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Внесение реагентов проводили на стадии логарифмического роста культур, достижение которой оценивали визуально по резко возросшему количеству митозов и численности клеток с помощью цифровой фотокамеры Altra20, снабженной программным обеспечением Analysis getIT (Olympus, Япония) на инвертированном микроскопе НУ-

2Е (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 312$ . Для достижения данной стадии опухолевым и нормальным клеткам требуется различный временной интервал вследствие отличий в скорости адгезии к субстрату, метаболизма веществ и пролиферации клеток [13, 14].

Клетки нейроэпителиальных опухолей культивировали на протяжении 2 сут [13], клетки нейроглиальной ткани культивировали на протяжении 28 сут [14] в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (Heracell, США) при 37°С, 95%-ной влажности и 5% парциальном давлении CO<sub>2</sub> [13, 14]. На жизнеспособность клеток, выделяемых из аутопсийных образцов, указывают данные литературы [15, 16]. Например, по оценкам МТТ, окрашивания на кальцеин и зеленым флуоресцентным красителем нуклеиновых кислот – SYTO-10 она составляет 77% и 82.1% соответственно [16]. Наличие и численность жизнеспособных клеток в аутопсийном материале подтверждается выходом их из эксплантов в количествах от 1.17 млн. до 37 млн./г ткани [15]. К 28-м суткам культивирования в посевах, полученных из фрагментов нейроглиальной ткани мозга идентифицируются следующие типы клеток: астроциты, олигодендроциты, микроглиоциты, нейроны [14].

*Протокол добавления реагентов.* Спустя указанный период на культуры клеток в чашках Петри вносили химиопрепараты: винкристин (Veropharm, РФ) –  $2.42 \times 10^{-9}$  М (0.02 мкг/мл), карбоплатин (Veropharm, РФ)  $10.8 \times 10^{-6}$  М (4 мкг/мл), метотрексат (Ebewe Pharma, Австрия)  $11.0 \times 10^{-5}$  М (50 мкг/мл), темозоломид (Orion Pharma, Финляндия) –  $10.3 \times 10^{-6}$  М (2 мкг/мл), циклофосфамид (Белмедпрепараты, РБ) –  $3.83 \times 10^{-5}$  М цисплатин (Veropharm, РФ) –  $3.33 \times 10^{-6}$  М (1 мкг/мл), цитарабин (Белмедпрепараты, РБ) –  $4.1 \times 10^{-6}$  М (1 мкг/мл), этопозид (Ebewe Pharma, Австрия) –  $1.55 \times 10^{-6}$  М (1 мкг/мл), человеческий рекомбинантный ФРН (Sigma-Aldrich, США)  $8.8 \times 10^{-9}$  М (0,1 мкг/мл), порознь или совместно с 10-кратно уменьшенной концентрацией химиопрепаратов.

*Оценка цитотоксической эффективности комбинаций фактора роста нервов с химиопрепаратами.* Оценку чувствительности клеток к тестируемым агентам проводили через 1 сут на основе изучения их гибели, визуализируемой по поглощению клетками 0.2%-го раствора трипанового синего (Alta Aesar, Германия) в камере Горяева (Минимед, РФ) [2]. Определяли индекс цитотоксичности лекарственных средств и ФРН на культурах клеток по формуле :

$$N\% = (1 - \text{Опыт/Контроль}) \times 100 \quad (1)$$

где N % – цитотоксический эффект реагентов, опыт – жизнеспособность клеток при действии химиопрепаратов, ФРН или комбинаций; контроль – жизнеспособность клеток в интактной серии [7].

Каждая серия экспериментов с каждым реагентом включала 5 посевов. Общее количество протестированных культур  $n=2787,0$ .

*Статистическая обработка данных.* Результаты представляли как арифметическая средняя плюс/минус стандартная ошибка средней для выборки ( $M \pm m$ ). Для сравнения двух групп по выраженности количественных признаков применяли стандартный t-тест Стьюдента, рассчитанный с помощью программы StatPlus 2005 пакета Statistica 6.0. Достоверными считали различие при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На культурах клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы была установлена цитотоксическая эффективность ФРН, сопоставимая с воздействием химиопрепаратов [17]. Было высказано предположение, что при комбинировании химиопрепаратов с ФРН который будет усиливать цитотоксический эффект фармпрепаратов (таблицы 1, 2, 3, 4).

Таблица 1.

*Индекс цитотоксичности (%) фактора роста нервов и его комбинации с химиопрепаратами при воздействии на клетки пилоцитарной астроцитомы*

Фактор роста нервов, комбинация ФРН + химиопрепарат	Индекс цитотоксичности, %	Процент изменения по отношению к ФРН
ФРН	45.0 ± 1.6	–
ФРН + Винкристин	56.4 ± 2.6 (*)	25.3 (*)
ФРН+ Карбоплатин	37.5 ± 2.7 (*)	-16.7(*)
ФРН+ Метотрексат	43.7 ± 2.6	-2.9
ФРН+ Темозоломид	42.2 ± 2.8	-6.2
ФРН+ Циклофосфамид	28.1 ± 1.9 (*)	-37.6(*)
ФРН+ Цисплатин	30.5 ± 2.8 (*)	-32.3 (*)
ФРН+ Цитарабин	27.9 ± 3.2 (*)	-38.0 (*)
ФРН+ Этопозид	63.8 ± 3.1(*)	41.8 (*)
Среднее значение ИЦ комбинаций	42.7 ± 1,1	-5.1

Примечание, здесь и табл. 2, 3, 4 колонка «процент изменения по отношению к ФРН» показывает процент, на который ИЦ комбинации фактора роста нервов с химиопрепаратами выше или ниже ИЦ фактора роста нервов при его обособленном действии (принимается за 100%). Знак «минус» указывает на ослабление эффективности комбинации относительно обособленного применения фактора роста нервов. Символом \* обозначены статистически

значимые ( $p < 0,05$ ) отличия воздействия комбинации фактора роста нервов с химиопрепаратами от его обособленного действия

Таблица 2.

*Индекс цитотоксичности (%) фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами при воздействии на клетки анапластической астроцитомы*

Фактор роста нервов, комбинация ФРН + химиопрепаратом	Индекс цитотоксичности, %	Процент изменения по отношению к ФРН
ФРН	45.9 ± 3.9	–
ФРН+ Винкристин	30.6 ± 3.7(*)	-33.3(*)
ФРН+ Карбоплатин	47.9 ± 4.1	4.4
ФРН+ Метотрексат	40.4 ± 3.9	-12.0
ФРН+ Темозоломид	52.4 ± 7.8(*)	14.2(*)
ФРН+ Циклофосфамид	37.0 ± 3.5(*)	-19.4(*)
ФРН+ Цисплатин	69.7 ± 4.7 (*)	47.9 (*)
ФРН+ Цитарабин	47.0 ± 3,5	2.4
ФРН+ Этопозид	53.8 ± 4.6(*)	17.2(*)
Среднее значение ИЦ комбинаций	46.8 ± 1.7	2.0

Таблица 3.

*Индекс цитотоксичности (%) фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами при воздействии на клетки глиобластомы*

Фактор роста нервов, комбинация ФРН + химиопрепарат	Индекс цитотоксичности, %	Процент изменения по отношению к ФРН
ФРН	50.6 ± 2.8	–
ФРН+ Винкристин	34.5 ± 4.7 (*)	-31.8 (*)
ФРН+ Карбоплатин	50.7 ± 2.8	0.2
ФРН+ Метотрексат	45.9 ± 5.0	-9.3
ФРН+ Темозоломид	44.5 ± 7.7	-12.1
ФРН+ Циклофосфамид	48.5 ± 5.0	-4.2
ФРН+ Цисплатин	42.4 ± 3.4	-16.2
ФРН+ Цитарабин	46.7 ± 4.8	-7.7
ФРН+ Этопозид	42.7 ± 3.4	-15.6
Среднее значение ИЦ комбинаций	44.6 ± 1.6 (*)	-11.9*

Данные табл. 1-4 показывают, что комбинированное применение ФРН с химиопрепаратами в десятикратно сниженной концентрации на культуры клеток исследуемых опухолей оказывает по сравнению с обособленным воздействием ФРН разнонаправленные эффекты:

1) комбинации ФРН с химиопрепаратами проявляли эффективность сопоставимую с обособленным применением ФРН на клетках пилоцитарной астроцитомы (ИЦ ФРН=45.0±1.6%, ИЦ комбинаций 42.7±1.1%,  $p=0.73$ ) и анапластической астроцитомы (ИЦ ФРН=45.9±3.9%, ИЦ комбинаций = 46.8±1.7%,  $p=0.10$ );

2) ИЦ комбинаций ФРН с химиопрепаратами (44.6±1.6%) был статистически значимо ( $p=0.005$ ) ниже ИЦ ФРН (50.6±2.8%) при действии на культуры клеток глиобластомы;

3) ИЦ комбинаций ФРН с химиопрепаратами (53.2±0.9%) был статистически значимо ( $p=0.02$ ) выше ИЦ ФРН (46.0±1.7%) при действии на культуры клеток медуллобластомы.

Таблица 4.

Индекс цитотоксичности (%) фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами при воздействии на клетки медуллобластомы

Фактор роста нервов, комбинация ФРН + химиопрепарат	Индекс цитотоксичности, %	Процент изменения по отношению к ФРН
ФРН	46.0 ± 1.7	–
ФРН+ Винкристин	59.8±1.7 (*)	30.0 (*)
ФРН+ Карбоплатин	49.8± 2.2	8.3
ФРН+ Метотрексат	51.9 ± 2.5	12.8
ФРН+ Темозоломид	47.0 ± 3.8	2.2
ФРН+ Циклофосфамид	45.9±2.2	-0.3
ФРН+ Цисплатин	57.1 ± 2.6 (*)	24.1(*)
ФРН+ Цитарабин	46.5 ± 2.7	1.1
ФРН+ Этопозид	64.0±2.4 (*)	39.1(*)
Среднее значение ИЦ комбинаций	53.2±0.9 (*)	15.7 (*)

На следующем этапе тестировали химиопрепараты, ФРН и его комбинацию с химиопрепаратами на клетках нейроглиальной аутопсийной ткани мозга лиц, скоропостижно скончавшихся в результате состояний, не связанных с патологией мозга. Чтобы оценить цитотоксичность ФРН на клетках нейроглиальной ткани, его действие сравнивали с химиопрепаратами, цитотоксический эффект которых хорошо известен. Для этого рассчитывали среднее значение ИЦ всех химиопрепаратов.

Были выделены 3 группы препаратов: 1) препараты, ИЦ которых статистически значимо ( $p<0,05$ ) превышал среднее значение; 2) препараты, ИЦ которых статистически значимо не отличался от среднего значения ( $p>0,05$ ); 3) препараты, ИЦ которых был ниже среднего значения ( $p<0,05$ ) (рис. 1).

На основании данных, представленных на рисунке 1, можно заключить, что:

1) действие на культуру клеток нейроглиальной ткани цитарабина, цисплатина, темозоломида, этопозид, метотрексата (62.5% посевов) не отличалось ( $p>0.05$ ) от среднего значения ИЦ химиопрепаратов (41.1±1.7%). ИЦ циклофосфамида и винкристина (25% посевов) был статистически

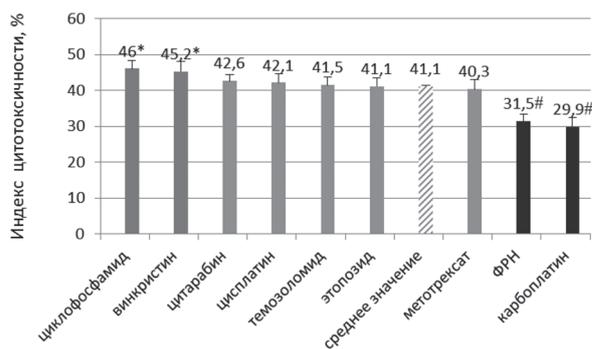


Рис. 1. Индекс цитотоксичности химиопрепаратов и фактора роста нервов при обособленном воздействии на клетки нейроглиальной ткани головного мозга человека. Препараты, ИЦ которых был статистически значимо ( $p<0,05$ ) выше среднего значения, выделены знаком \*; препараты, ИЦ которых был статистически значимо ( $p<0,05$ ) ниже среднего значения выделены знаком #.

значимо выше ( $p<0.05$ ), карбоплатина (12.5% посевов) – ниже ( $p<0.05$ ) среднего значения ИЦ химиопрепаратов.

2) фактор роста нервов при его обособленном применении на культуре клеток нейроглиальной ткани, обладал статистически значимо ( $p<0.05$ ) более низким цитотоксическим эффектом (ИЦ ФРН=31.5±1.9%,) по сравнению со всеми химиопрепаратами за исключением карбоплатина, что документирует менее токсичное его действие на культуру клеток нейроглиальной ткани.

Комбинированное воздействие ФРН с химиопрепаратами на культуру клеток нейроглиальной ткани мозга человека сравнивали с обособленным действием ФРН (рис. 2).

На основании данных, представленных на рисунке 2 можно заключить, что: цитотоксиче-

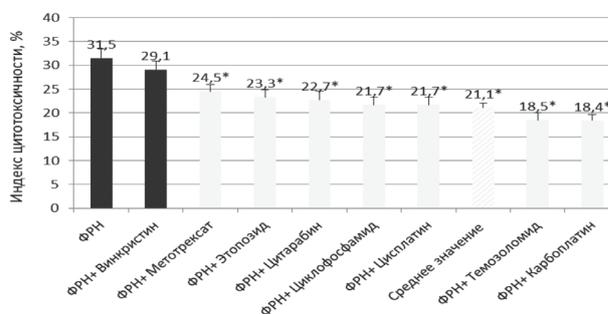


Рис. 2. Индекс цитотоксичности химиопрепаратов и фактора роста нервов при комбинированном воздействии на клетки нейроглиальной ткани головного мозга человека. Символом \* обозначены статистически значимые ( $p<0,0001$ ) отличия от обособленного воздействия фактора роста нервов

ское воздействие комбинаций ФРН с химиопрепаратами на культуру клеток нейроглиальной ткани человека в 87.5% посевов ( $n=350$ ) оказалось ниже ( $p<0.0001$ ) обособленного действия ФРН.

Эффективность цитотоксического действия ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами на культуры клеток мозговых неоплазий (анапластическая астроцитома, пилоцитарная астроцитома, глиобластома, медуллобластома) статистически значимо превышает, либо не отличается от действия химиопрепаратов (табл. 5).

Эффективность цитотоксического действия ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами на культуры клеток мозговых неоплазий (анапластическая астроцитома, пилоцитарная астроцитома, глиобластома, медуллобластома) статистически значимо превышает, либо не отличается от действия химиопрепаратов (табл. 5).

Приведенные данные о воздействии комбинаций ФРН с химиопрепаратами на культуры нейроэпителиальных опухолей ставят вопрос о механизмах их действия. Например, эффективность комбинированного воздействия цисплатина и ФРН на первичных культурах высокозлокачественной глиомы, эпендимобластомы и медуллобластомы подтверждает работа [18], где ФРН блокировал пролиферацию и индуцировал фенотипическую конверсию опухолевых клеток с превращением их в нейробласты за счет стимуляции дифференцировки и гена раннего реагирования гомолога-К онкогена *v-Maf* мускулоапоневротической фибросаркомы – *tafk*. Цисплатин запускал апоптоз через активацию генов-супрессоров опухолей *p63*, *p73*.

Напрашивается вопрос: каким образом ФРН или другие ростовые факторы влияют на эффективность химиотерапии у онкологических пациентов? В одном исследовании пролечено 280

человек в возрасте от 6 мес. до 20 лет с нейробластомой, медуллобластомой, нейрофибросаркомой и другой патологией комбинациями химиопрепаратов с гранулоцитарно-колониестимулирующим – G-CSF и гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим – GM-CSF факторами (5 мг/кг веса/сут), в результате чего сокращался период нейтропении и уменьшалась частота инфекций [19, 20]. В работе [20] изучены концентрации циркулирующего в крови ФРН у 23 пациентов с мелкоклеточным раком легкого, молочной железы, яичников, желудка при химиотерапии цисплатином, карбоплатином, гемцитабином, виролемином. Установлено, что снижение уровня ФРН коррелирует с повышением нейротоксичности организма, индуцируемой химиопрепаратами.

Таким образом, наиболее предпочтительным в качестве кандидата для дальнейших исследований *in vivo* выглядят комбинации ФРН с химиопрепаратами, поскольку они обладают избирательной цитотоксичностью в отношении культур клеток нейроэпителиальных опухолей и нейроглиальной ткани, то есть: обладают одинаковой или повышают эффективность химиопрепаратов при действии на опухолевую ткань, и проявляют значительно более низкую ( $p<0,0001$ ) цитотоксичность по сравнению с химиопрепаратами на клетки нейроглиальной ткани. Поэтому комбинированное применение ростовых факторов с химиопрепаратами представляется одним из направлений повышения эффективности химиотерапии нейроэпителиальных опухолей.

## ВЫВОДЫ

1. Комбинации ФРН с химиопрепаратами проявляли эффективность, сопоставимую с обособленным применением ФРН на клетках пилоцитарной астроцитомы (ИЦ ФРН  $45.0 \pm 1.6\%$ , ИЦ

Таблица 5.

Индекс цитотоксичности (%) химиопрепаратов, фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами при воздействии на культуры клеток мозговых неоплазий и нейроглиальной ткани человека

Тип ткани	Средний индекс цитотоксичности, %				
	химиопрепарата		ФРН, %		комбинаций ФРН+химиопрепараты, %
Глиобластома	$40.7 \pm 0.3$	<	<b><math>50.6 \pm 2.8</math> (*)</b>	>	<b><math>44.6 \pm 1.6</math> (^)</b>
Медуллобластома	$38.4 \pm 0.08$	<	<b><math>46.0 \pm 1.7</math> (*)</b>	<	<b><math>53.2 \pm 0.9</math> (^)</b>
Пилоцитарная астроцитома	$45.4 \pm 0.03$	=	$45.0 \pm 1.6$	=	$42.7 \pm 1.1$
Анапластическая астроцитома	$41.8 \pm 0.1$	=	$45.9 \pm 3.9$	=	$46.8 \pm 1.7$
Нейроглиальная ткань	$41.1 \pm 1.7\%$	>	<b><math>31.5 \pm 1.9\%</math> (*)</b>	>	$21.1 \pm 0.9\%$ (^)

Примечание, символом \* обозначены статистически значимые ( $p<0.05$ ) отличия индекса цитотоксичности фактора роста нервов от химиопрепаратов. Символом ^ обозначены статистически значимые ( $p<0.05$ ) отличия индекса цитотоксичности комбинаций фактора роста нервов с химиопрепаратами от его обособленного воздействия

комбинаций  $42.7 \pm 1.1\%$ ,  $p=0.73$ ) и анапластической астроцитомы (ИЦ ФРН  $45.9 \pm 3.9\%$ , ИЦ комбинаций  $46.8 \pm 1.7\%$ ,  $p=0.1$ ). ИЦ комбинаций ФРН с химиопрепаратами ( $44.6 \pm 1.6\%$ ) был статистически значимо ( $p=0.005$ ) ниже ИЦ ФРН ( $50.6 \pm 2.8\%$ ) при действии на культуры клеток глиобластомы. ИЦ комбинаций ФРН с химиопрепаратами ( $53.2 \pm 0.9\%$ ) был статистически значимо ( $p=0.02$ ) выше ИЦ ФРН ( $46.0 \pm 1.7\%$ ) при действии на культуры клеток медуллобластомы.

2. При обособленном применении на культуре клеток нейроглиальной ткани индекс цитотоксичности ФРН (ИЦ  $31.5 \pm 1.9\%$ ) был более низким ( $p<0.05$ ), по сравнению с действием химиопрепаратов (ИЦ химиопрепаратов  $41.1 \pm 1.7\%$ ).

3. Эффективность цитотоксического влияния комбинации ФРН с химиопрепаратами на нейроглиальную ткань человека (ИЦ  $21.1 \pm 0.9\%$ ), в 87.5% посевов оказалась статистически значимо ( $p<0.001$ ) более низкой по сравнению с обособленным воздействием ФРН (ИЦ  $31.5 \pm 1.9\%$ ), ИЦ которого был ниже ( $p<0.05$ ) ИЦ химиопрепаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Статистика онкологических заболеваний / А.Е. Океанов [и др.] ; под ред.: О. Г. Суконко. — Минск : ГУ «РНПЦ ОМиР им. Н. Н. Александрова», 2013. — 373 с.
2. International agency for research of cancer (Globocan ) [Electronic resource]: the World of Health Organization, 2012. — Mode of access : <http://www.globocan.iarc.fr>. — Data of access : 23.03.2015.
3. Савва Н.Н. Злокачественные новообразования у детей Беларуси : заболеваемость, выживаемость, смертность, подходы к паллиативной помощи / Н.Н. Савва, А.А. Зборовская, О.В. Алейникова. — Минск : Респ. науч. мед. б-ка, 2008. — 180 с.
4. Lafay-Cousin L. Current treatment approaches for infants with malignant central nervous system tumors / L. Lafay-Cousin, D. Strother // *The Oncologist*. — 2009. — Vol. 14, № 4. — P. 433–444.
5. CNS germ cell tumor (CNSGCT) of childhood : presentation and delayed diagnosis / J. R. Crawford [et al.] // *Neurology*. — 2007. — Vol. 68, № 20. — P. 1668–1673.
6. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy / F. Safdie [et al.] // *PLoS One*. — 2012. — Vol. 7, № 9 — e44603.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов [и др.] ; под ред.: А. Г. Муляра, О. Н. Чиченкова. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.
8. Pimentel E. Handbook of growth factors : [in 3 vol.] / E. Pimentel / CRC Press Inc. — London ; Tokyo, 1994. — Vol. 2. Ch. 5 : Neurotrophic growth factors. — P. 217–240.
9. Калюнов, В. Н. Биология фактора роста нервной ткани / В. Н. Калюнов. — Минск : Наука и техника, 1986. — 208 с.
10. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor : thirty-five years later / R. Levi-Montalcini // *The EMBO J*. — 1987. — Vol. 6, № 5. — P. 1146–1154.
11. TrkA alternative splicing : a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma / A. Tacconelli [et al.] // *Cancer Cell*. — 2004. — Vol. 6, № 4. — P. 347–360.
12. Clinically relevant resistance in cancer chemotherapy / Eds.: B. Andersson, D. Murray. — USA : Kluwer Academic Publishers, 2002. — 389 p.
13. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В. П. Божкова [и др.] ; под ред.: Б. П. Вепринцева, И. В. Викторова, Б. Я. Вильнера. — М. : Наука, 1988. — 318 с.
14. Gibbons H. M. Adult human brain cell culture for neuroscience research / H. M. Gibbons, M. Dragunow // *Intern. J. of Biochemistry and Cell Biology*. — 2010. — Vol. 42. — P. 844–856.
15. Development of a rapid autopsy program for studies of brain immunity / A. Ghorpade [et al.] // *J. of Neuroimmunology*. — 2005. — Vol. 163. — P. 135–144.
16. Isolation of living neurons from human elderly brains using the immunomagnetic sorting DNA-linker system / Y. Konishi [et al.] // *The Amer. J. of Pathology*. — 2002. — Vol. 161, № 5. — P. 1567–1576.
17. Влияние химиопрепаратов и фактора роста нервов на выживаемость клеток первичной культуры нейроэпителиальных опухолей / А. Н. Чернов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук*. — 2013. — № 1. — С. 46–51.
18. Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependymoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor / A. Antonelli [et al.] // *Cancer Investigation*. — 2007. — Vol. 25, № 2. — P. 94–101.
19. Применение комбинации гемопоэтических факторов роста после высокодозовой химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток / Е. А. Кузмич [и др.] // *Медицина*. — 2010. — № 4. — С. 64–68.

Чернов А. Н.

20. Patients treated with antitumor drugs displaying neurological deficits are characterized by a low circulating level of nerve growth factor /

S. de Santis [et al.] // *Clinical Cancer Research*. — 2000. — Vol. 6, № 1. — P. 90–95.

*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси*

*Чернов А.Н., научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии*

*Тел.: +37529-394-10-95 (Velcom)*

*E-mail: al.chernov@mail.ru*

*Institute of Physiology, the National academy of sciences of Belarus*

*Chernov A.N., scientific researcher at the Laboratory of Neurophysiology*

*Ph.: +37529-394-10-95 (Velcom)*

*E-mail: al.chernov@mail.ru*