

ДЕЙСТВИЕ ФОТЕМУСТИНА НА КЛЕТКИ ЛИНИЙ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

© Л. Н. Киселева,^{1,*} А. В. Карташев,^{1,3} Н. Л. Вартамян,¹
А. А. Пиневиц,^{1,2} М. П. Самойлович^{1,2}

¹ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. И. М. Гранова, Санкт-Петербург, 197758,

² С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, и

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 191015;

* электронный адрес: luba_kiseleva@mail.ru

Глиобластомы — гетерогенная группа опухолей, имеющих нейроэктодермальное происхождение. Культуры опухолевых клеток, полученных от пациентов с глиобластомами, различаются по морфологии, фенотипу и генетическим особенностям. В работе использованы культивируемые клеточные линии глиобластом A172 и T98G, известные с 70-годов XX в., а также новые линии глиобластом R1 и T2, полученные в 2010 г. из операционного материала пациентов. Цель работы состояла в оценке влияния алкилирующего противоопухолевого препарата фотемустина (ФМ) при однократном и повторном воздействиях на выживаемость и пролиферацию линий глиобластом, а также на экспрессию ими генов ряда ростовых факторов, генов белков внеклеточного матрикса, ряда генов мезенхимных клеток, а также гена транскрипционного фактора Zeb1. Действие ФМ на клетки линий A172 и R1 отличалось от действия на клетки T98G и T2. Доза, при которой погибает 50 % клеток (LD₅₀), для клеток A172 составляла 60, для клеток T98G — 250 мкг/мл. Однократное воздействие ФМ в дозе 100 мкг/мл на линии A172 и R1 приводило к гибели всех клеток в культуре. Сублетальные дозы ФМ вызывали в клетках этих линий снижение активности всех исследованных генов. В клетках глиобластом T98G и T2 после культивирования в присутствии ФМ в сублетальных дозах выявлялись две популяции — пролиферирующие и непролиферирующие переживающие клетки. Дозы ФМ свыше 300 мкг/мл приводили к доминированию в популяциях переживающих клеток, которые сохраняли жизнеспособность в течение 1.5 мес. Действие ФМ на линии T98G и T2 сопровождалось ростом активности всех исследованных генов. Сделано заключение о том, что после воздействия ФМ в линиях T98G и T2 выявляется популяция устойчивых к препарату переживающих клеток, активно экспрессирующих гены факторов, ассоциированных с эпителиально-мезенхимным переходом (ЭМП). Обсуждается возможное влияние непролиферирующих, но активно продуцирующих ростовые факторы клеток на опухолевое микроокружение.

Ключевые слова: глиобластома, клетки A172, клетки T98G, хлорэтилнитрозомочевина, фотемустин, гены ростовых факторов, гены белков внеклеточного матрикса, Zeb1, переживающие клетки.

Принятые сокращения: ФМ — фотемустин, ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка, ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход, dNTP — дезоксинуклеозидтрифосфаты, EGF — эпидермальный фактор роста, FAP — белок активированных фибробластов, FGF2(b) — основной фактор роста фибробластов 2, GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, HGF — фактор роста гепатоцитов, αSMA — гладкомышечный актин α2, TGFβ1 — трансформирующий ростовой фактор β1, THBS1 — тромбоспондин-1, TNC — тенасцин С, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Глиобластомы являются одними из наиболее агрессивных опухолей головного мозга человека. При проведении стандартных протоколов комплексного лечения этого заболевания, включающих в себя радикальную операцию, химиотерапию и лучевую терапию, выживаемость пациентов редко превышает 12—15 мес. В настоящее время в клинической практике широко используются химиотерапевтические препараты из группы производных нитрозомочевины. Фотемустин (ФМ) является производным хлорэтилнитрозомочевины и представляет собой диэтил-1- $\{1-[3-(2\text{-хлорэтил})-3\text{-нитрозоуреидо}]\}$ этилфосфонат (Beauchesne, 2012). Наличие в химической структуре фосфоаланиновой группы облегчает проникновение ФМ в опухолевые клетки. Противоопухолевая ак-

тивность ФМ связана с его способностью алкилировать ДНК. Алкилирующее действие проявляется в индукции разрывов ДНК, образовании сшивок внутри и между молекулами ДНК, между ДНК и белками. Исходно ФМ применяли для лечения меланом, этот препарат обладает высокой липофильностью и способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, что позволяет использовать его в терапии глиобластом (Beauchesne, 2012).

Известно, что наряду с проявлением противоопухолевой активности алкилирующие препараты способны индуцировать появление резистентных к их действию клонов опухолевых клеток, во многом определяющих дальнейшую прогрессию заболевания. Изучение этой стороны действия химиотерапевтических препаратов не-

обходимо для оптимизации существующей терапии и поиска новых подходов в лечении онкологических заболеваний.

В настоящей работе было проведено исследование действия ФМ на клетки четырех линий глиобластом. Линии A172 и T98G были получены в 70-х годах XX в. (Giard et al., 1973; Stein, 1979) и с тех пор используются во многих лабораториях в качестве модельных объектов. Известно, что в ходе длительного культивирования клетки могут утрачивать исходно присущие им признаки и приобретать новые, поэтому клетки этих линий были предварительно охарактеризованы. Было показано, что клетки A172 и T98G сохраняют основные свойства глиобластом, но существенно отличаются друг от друга по морфологии, фенотипу и профилю экспрессии ряда генов (Yachi et al., 2008; Melendez et al., 2011; Agnihotri et al., 2012; Киселева и др., 2016).

Две новые линии глиобластом R1 и T2 были получены из операционного материала в 2010 г. и позднее охарактеризованы (Киселева и др., 2017).

Задача настоящей работы заключалась в оценке влияния ФМ на пролиферацию клеток линий глиобластом A172, T98G, R1 и T2, экспрессию в них генов ряда ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса, мезенхимных клеток и гена транскрипционного фактора Zeb1.

Материал и методика

Клеточные линии. Клетки A172 и T98G были получены из коллекции клеточных культур НИИ гриппа МЗ РФ (Санкт-Петербург). Клеточные линии R1 и T2 были выделены из операционного материала пациентов в Лаборатории клеточной биологии ФГБУ ПИЯФ. Клетки линий глиобластом культивировали в ростовой среде, содержащей α -MEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), глютамин и гентамицин. Клетки культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в воздушной среде. Пересев клеток проводили каждые 3—4 сут, используя раствор из смеси трипсина и версена.

Воздействие ФМ на клетки. ФМ (препарат Мюстофоран) растворяли в 96 %-ном этаноле, замораживали и хранили при –80° C. Раствор размораживали непосредственно перед внесением в клеточную культуру и разводили до необходимой концентрации в бессывороточной среде α -MEM (Iwata et al., 1988). Для оценки выживаемости клеток их рассеивали в 96-луночные планшеты (8 тыс. клеток на лунку). Клетки в логарифмической фазе роста культивировали в течение 1 ч в бессывороточной среде, содержащей ФМ, трижды отмывали бессывороточной средой и культивировали далее в ростовой среде обычного состава. Замену половины ростовой среды на свежую проводили на 4-е сут культивирования. Контролем служили клетки, которые в течение 1 ч культивировали в бессывороточной среде. Для обработки клеток использовали ФМ в концентрации 0.5—750 мкг/мл. На 7-е сут культивирования проводили подсчет клеток, снятых с поверхности планшетов, с помощью кондуктометрического счетчика Z1 Coulter Counter (Beckman Coulter, США).

При постановке остальных экспериментов клетки всех четырех линий культивировали во флаконах до 70%-ного конфлюэнтного монослоя и затем культивировали в течение 1 ч в бессывороточной среде в присутствии ФМ. Дозы препарата рассчитывали в зависимости от

ЛД₅₀, установленной по выживаемости клеточных культур. После удаления препарата каждые 2—3 сут проводили замену 2/3 ростовой среды, и по достижении клетками 70—80%-ного монослоя их пересевали, а затем подвергали повторному воздействию ФМ.

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

ДНК-цитометрия. Для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла клетки снимали с поверхности флаконов и трижды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором. Выделение и окраску ядер проводили с использованием набора реагентов Cycle Test Plus DNA согласно рекомендациям фирмы-производителя. Для сбора данных использовали программу CellQuest Pro (Becton Dickinson, США), результаты анализировали с помощью специализированного программного обеспечения ModFit (Verity Software House, Topsham, ME).

Оценка активности генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Этапы выполнения анализа и последовательности использованных праймеров описаны ранее (Киселева и др., 2016). Для реакции обратной транскрипции во всех образцах использовали 500 нг РНК. Уровень экспрессии генов представляли в виде разницы между пороговым циклом исследуемого гена и гена сравнения *GAPDH* (Δ CT; CT — пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции). Для сравнения уровня экспрессии генов в клетках после воздействия ФМ использовали метод относительного количественного определения экспрессии гена (метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ представляет собой кратность разницы между экспрессией гена в обработанных ФМ и интактных клетках (Livak, Schmittgen, 2001).

Использованные реактивы: среда α -MEM, глютамин, гентамицин, раствор трипсина—версена, фосфатно-солевой раствор без Ca²⁺ и Mg²⁺, трипановый синий (БиолоТ, Россия); набор красителей Май-Грюнвальд—Гимза (Bio-Optica, Италия); ЭТС NuClone (Thermo Scientific, США); Мюстофоран (Сенекс-Лаборатории Тиссен С. А., Бельгия); Cell Cycle Test Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка. Эксперименты проводили в 3—6 повторностях. Для статистической обработки данных использовали программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. Для проверки достоверности различий применяли U-критерий Манна—Уитни.

Результаты

Культивирование клеток всех изучаемых линий с ФМ приводило к изменению формы и увеличению их размера. Через 3 сут после воздействия препарата клетки A172 и R1 приобретали вытянутую форму с длинными отростками, появлялись клетки с фрагментированными ядрами, характерными для поздних стадий апоптоза (рис. 1, б,

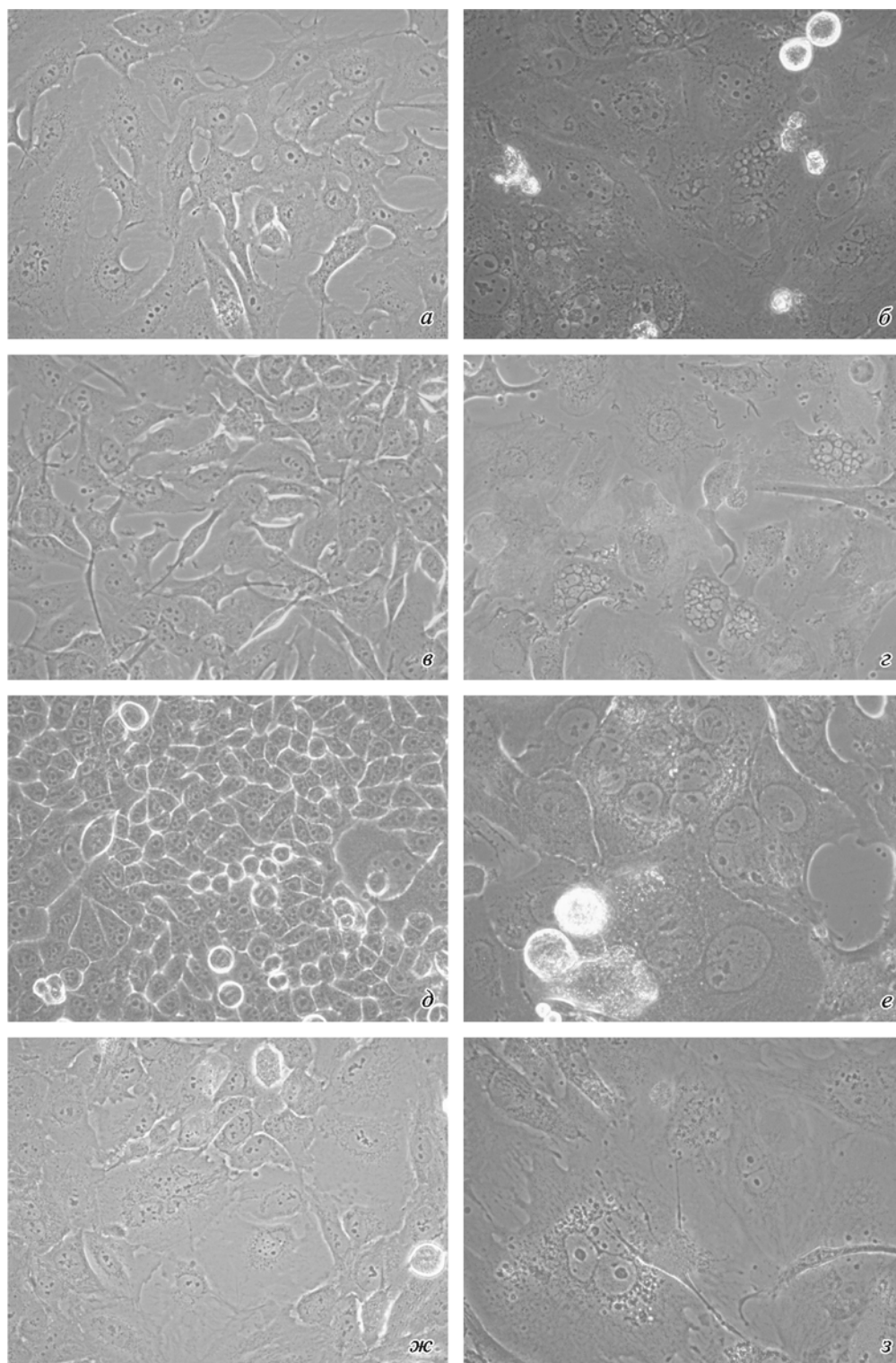


Рис. 1. Клетки линий глиобластом человека А172 (а, б), R1 (в, г), Т98G (д, е) и Т2 (ж, з).

а, в, д, ж — контроль; б, г — через 3 сут после воздействия фотемустина (ФМ) в концентрациях 50 и 100 мкг/мл соответственно; е, з — через 15 сут после воздействия 300 мкг/мл ФМ. Фазовый контраст, об. 40×.

г). В линиях Т98G и Т2 под действием ФМ появлялись клетки, распластанные по поверхности флакона (рис. 1, е, з).

Для определения зависимости выживаемости клеток глиобластом от дозы ФМ использовали линии А172 и Т98G. Клетки обрабатывали раствором ФМ в concentra-

ции 0.5—750 мкг/мл и на 7-е сут определяли число клеток, снятых с культуральной поверхности. ЛД₅₀ для клеток линии А172 составила 60, для линии Т98G — 250 мкг/мл (рис. 2). На основании этих результатов были выбраны условия для постановки дальнейших экспериментов.

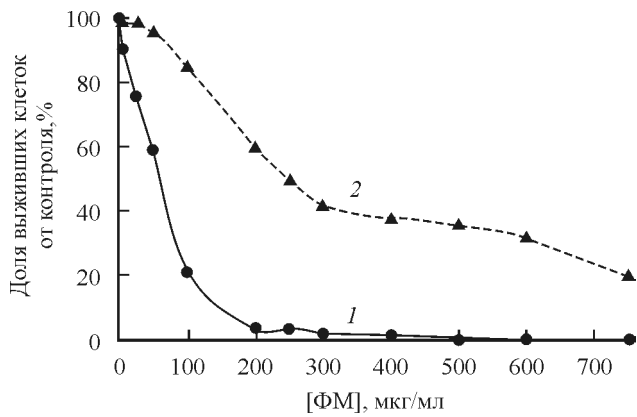


Рис. 2. Зависимость действия ФМ на клетки A172 (кривая 1) и T98G (кривая 2) от его дозы через 7 сут.

Большинство (60,92 %) интактных клеток A172 находилось в фазе G_1 клеточного цикла, а в фазах S и G_2 — соответственно 27,94 и 11,14 %. Похожее соотношение наблюдалось и для клеток линии T98G: 59,5 (фаза G_1), 33,5 (фаза S) и 7,0 % (фаза G_2). После воздействия ФМ боль-

шинство клеток обеих линий находилось в фазе G_2 . Так, после культивирования линии A172 в присутствии ФМ в концентрации 50 мкг/мл в фазе G_2 было 87,1 % клеток; в популяции T98G, обработанной ФМ в концентрации 300 мкг/мл, — 93,1 % клеток (рис. 3).

Однократная обработка 100 мкг/мл ФМ клеток линии A172 вызывала их гибель к 12-м сут. При снижении дозы ФМ до 50 мкг/мл часть клеток в популяции сохраняла способность к пролиферации. Такие клетки далее обозначены как резистентные. Резистентные клетки после достижения ими 70—80 % конфлюэнтного монослоя пересеивали, а затем снова обрабатывали ФМ. Повторное культивирование резистентных клеток с ФМ в концентрации 100 мкг/мл не приводило к полной остановке пролиферации. Увеличение дозы ФМ от 100 до 200 мкг/мл вызывало гибель всех клеток (см. таблицу).

При обработке 100 мкг/мл ФМ часть клеток линии R1 погибала, оставшиеся клетки сохраняли способность пролиферировать. Культивирование клеток R1 с ФМ в дозе 300 мкг/мл приводило к гибели всей культуры к 17-м сут. Повторное воздействие 100 мкг/мл ФМ на клетки, пережившие первое воздействие 100 мкг/мл препарата, не останавливало пролиферацию этих клеток, однако увели-

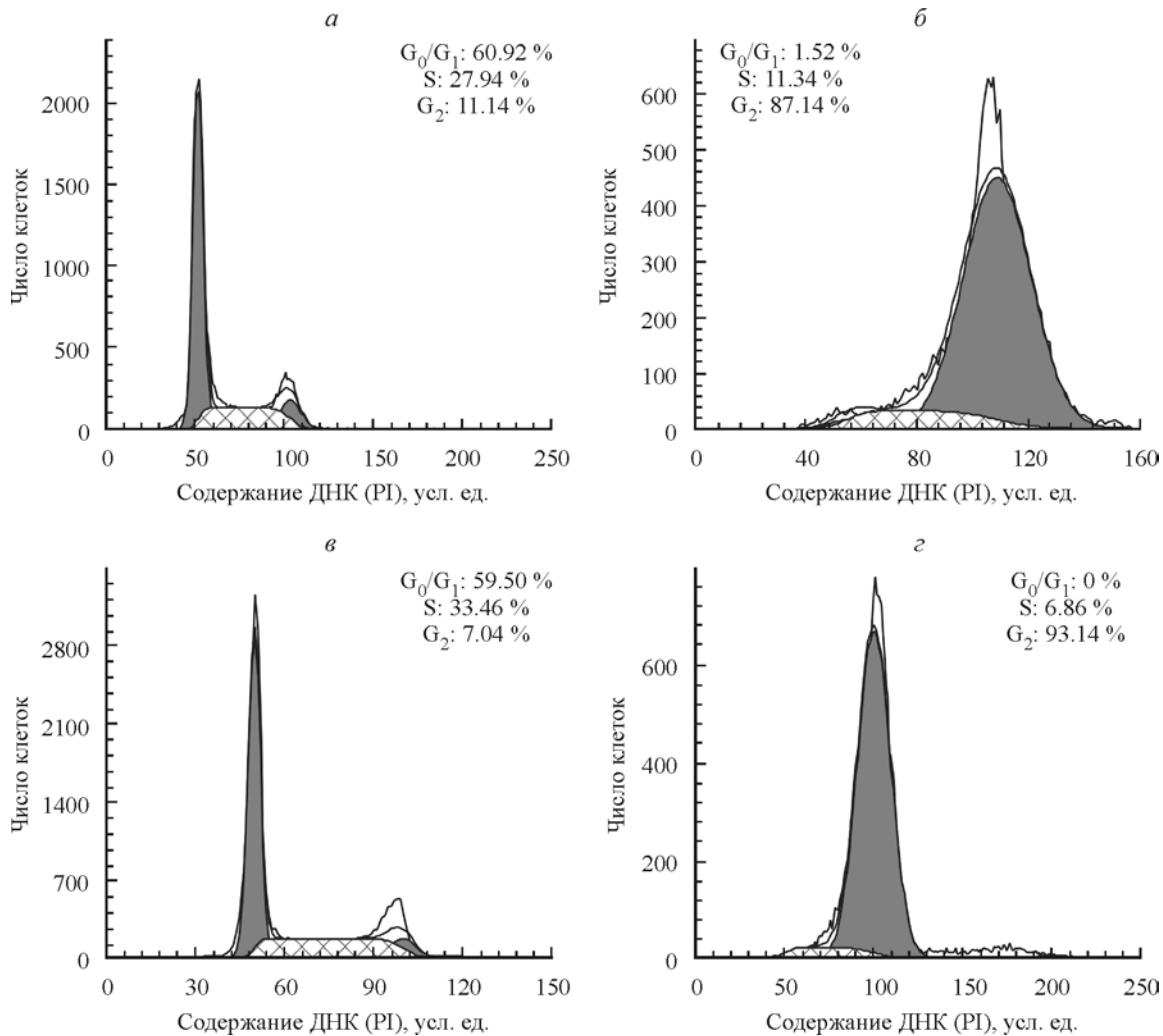


Рис. 3. Гистограмма распределения клеток линий A172 (а, б) и T98G (в, г) по фазам клеточного цикла в контроле (а, в) и после действия ФМ (б, г). ДНК-цитометрия.

По горизонтали — интенсивность флуоресценции иодистого пропидия (PI), связывание которого пропорционально количеству ДНК в ядре клетки; по вертикали — число клеток. Концентрации ФМ 50 (б) и 300 (г) мкг/мл.

Влияние ФМ на выживаемость и пролиферацию клеток линий глиобластом

Доза ФМ, мкг/мл	Клеточная линия			
	A172	R1	T98G	T2
После первого воздействия ФМ сохраняются				
50	ПК	ПК	ПК и ПЖК	ПК и ПЖК
100	Все погибают	ПК	То же	То же
300	То же	Все погибают	Только ПЖК	Только ПЖК
750	» »	То же	То же	То же
После повторного воздействия ФМ сохраняются				
100	ПК	ПК	ПК и ПЖК	ПК и ПЖК
200	Все погибают	Н. О.	То же	Н. О.
300	То же	Все погибают	» »	Только ПЖК
400	» »	То же	Только ПЖК	Н. О.
500	» »	» »	То же	То же

Примечание. ПК — пролиферирующие клетки, ПЖК — переживающие, но не пролиферирующие клетки; Н. О. — не определяли.

чение дозы до 300 мкг/мл при повторном воздействии приводило к их гибели (см. таблицу).

В популяции T98G при однократном воздействии ФМ в концентрации 100 мкг/мл часть клеток погибала, при этом в культуре оставались резистентные, способные к пролиферации клетки, а также непролиферирующие переживающие клетки (см. таблицу). Увеличение дозы до 200 мкг/мл вызывало неоднозначный эффект. В одних случаях препарат в этой дозе полностью блокировал пролиферацию, в других часть клеток, способных к пролиферации, сохранялась. После однократного воздействия более высоких доз ФМ (300—750 мкг/мл) в культуре оставались только непролиферирующие переживающие клетки, сохранявшие жизнеспособность более 1.5 мес (рис. 1, *е*, *з*). Эта переживающая популяция была представлена одноядерными и многоядерными крупными клетками. Повторная обработка клеток, перенесших первое воздействие ФМ в дозе 100 мкг/мл, не препятствовала появлению очагов пролиферации, если вторая доза ФМ не превышала 300 мкг/мл (рис. 4, *а*; см. таблицу). При увеличении дозы ФМ до 400 мкг/мл в культуре оставались только непролиферирующие переживающие клетки (рис. 4, *б*). Культивирование

переживающих клеток в среде, содержащей 200 и 500 мкг/мл ФМ, не оказывало влияния на их жизнеспособность.

Среди клеток линии T2 под воздействием ФМ также выявлялись две популяции — пролиферирующие и непролиферирующие клетки. После культивирования с ФМ в дозе 100 мкг/мл присутствовали обе популяции, при увеличении дозы до 300 мкг/мл оставались только переживающие клетки. При повторном воздействии ФМ в дозе 100 мкг/мл на резистентные пролиферирующие клетки, сохранившиеся после действия первой дозы 100 мкг/мл ФМ, пролиферация клеток T2 сохранялась, а при увеличении дозы до 300 мкг/мл — прекращалась. При этом в культуре оставались непролиферирующие переживающие клетки, способные сохранять жизнеспособность в течение 2 мес (см. таблицу).

Экспрессию генов ростовых факторов *TGFβ1*, *VEGF*, *FGF2(b)*, *EGF*, *HGF*, генов *FAP* и *αSMA*, характерных для мезенхимных клеток, генов белков внеклеточного матрикса тенасцина С (*TNC*) и тромбоспондина 1 (*THBS1*), а также гена транскрипционного фактора *Zeb1* оценивали в интактных и подвергнутых действию ФМ клетках всех четырех линий глиобластом.

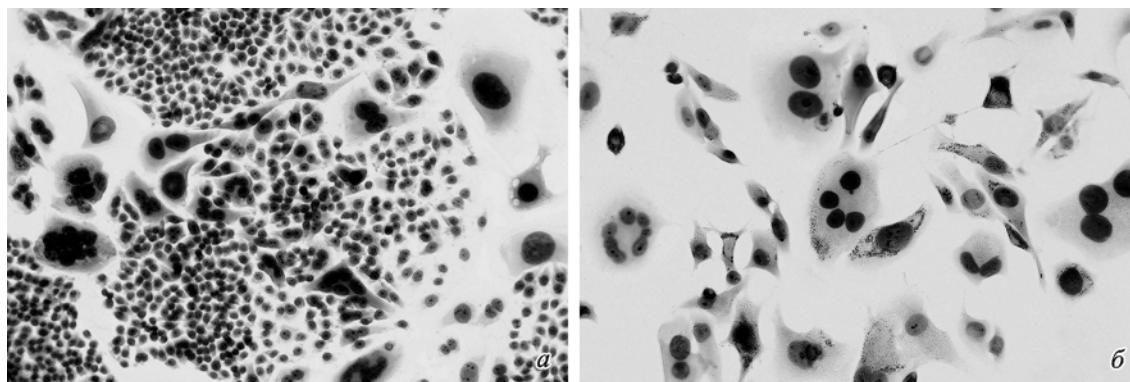


Рис. 4. Клетки линии глиобластомы T98G, перенесшие первое воздействие ФМ в дозе 100 мкг/мл и повторное воздействие в дозе 300 мкг/мл (*а*) или 500 мкг/мл (*б*) ФМ.

Показаны пролиферирующие и переживающие (одно- и многоядерные) клетки (*а*) и только переживающие клетки (*б*). Окраска по Май-Грюнвальду—Гимзе. Об. 20×.

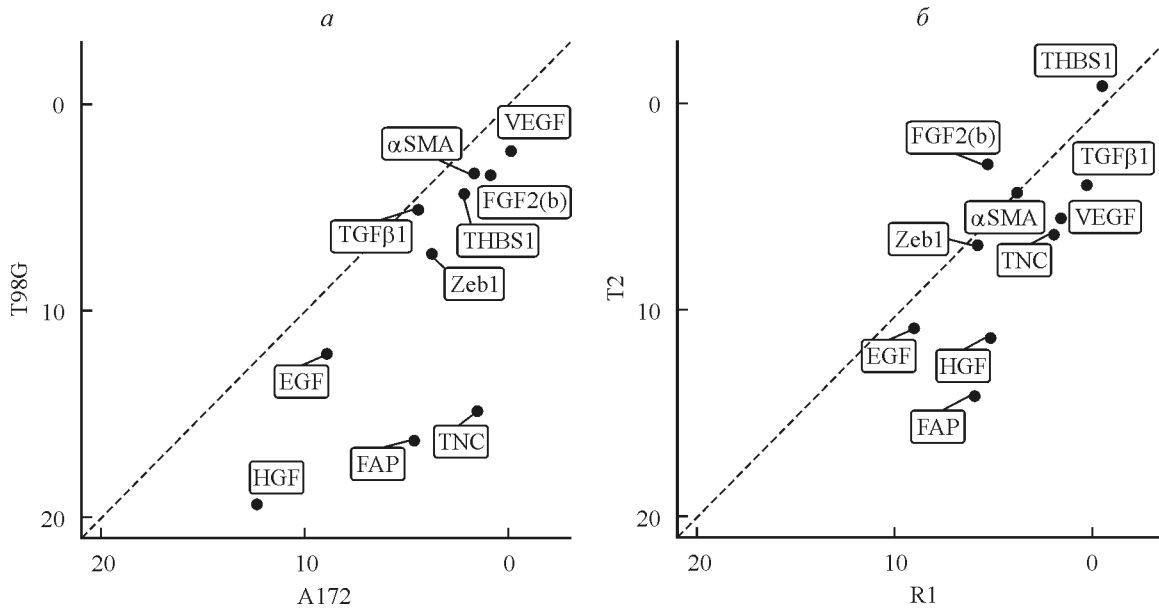


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии генов (ΔCT , черные кружки) в клетках линий глиобластом A172, T98G (а) и R1, T2 (б).

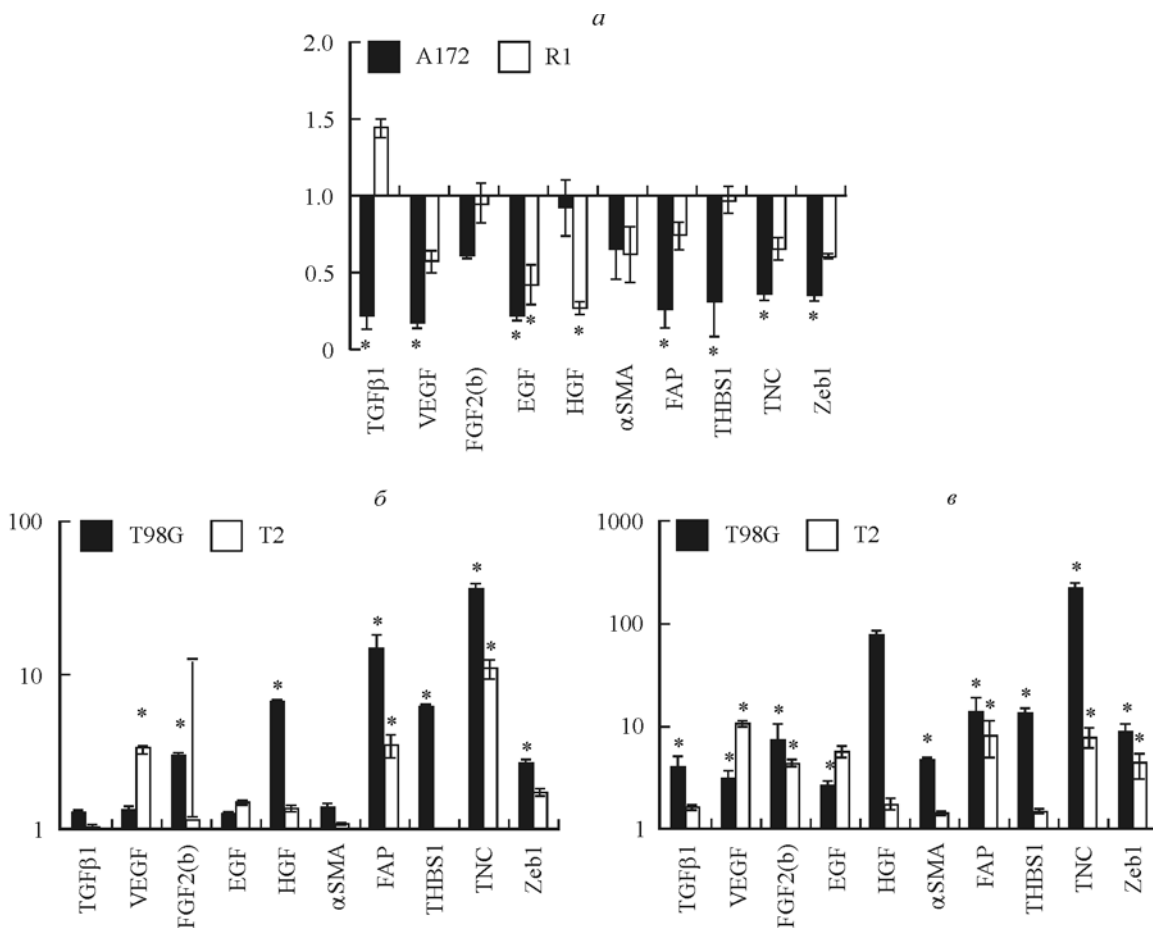


Рис. 6. Изменение экспрессии генов после однократного воздействия ФМ в следующих концентрациях: 50 мкг/мл в клетках A172 и R1 (а), 100 мкг/мл в клетках T98G и T2 (б), 300 мкг/мл в клетках T98G и T2 (в).

По горизонтали — исследуемые гены; по вертикали — $2^{-\Delta\Delta CT}$ (кратность разницы между экспрессией гена в обработанных ФМ и интактных клетках). За единицу принят уровень активности генов в контрольных клетках; звездочка показывает достоверность различия при $P \leq 0.05$ (критерий Манна—Уитни); вертикальные отрезки — стандартное отклонение.

Интактные клетки A172 характеризовались более высокой по сравнению с клетками T98G экспрессией генов *HGF*, *FAP* и *TNC* и мало различались по уровню активности от остальных исследованных генов (Киселева и др., 2016) (рис. 5). Аналогичные различия, но менее выраженные, были выявлены при сравнении клеток линий R1 и T2. В клетках R1 экспрессия большинства генов была выше, чем в клетках T2; наиболее отчетливые различия отмечены в отношении генов *HGF* и *FAP*.

При однократном воздействии 50 мкг/мл ФМ значительная часть клеточных популяций A172 и R1 погибала, при этом экспрессия большинства изученных генов, выявленная в резистентных клетках после их пересева, была снижена. В клетках линии A172 после воздействия ФМ происходило снижение активности генов *TGFβ1*, *VEGF*, *EGF*, *FAP*, *THBS1*, *TNC* и *Zeb1*. В клетках R1 после обработки ФМ снижалась экспрессия *EGF* и *HGF*. Остальные гены демонстрировали тенденцию к снижению экспрессии или отсутствие реакции на препарат (рис. 6, а). Повторное воздействие 100 мкг/мл ФМ на резистентные клетки A172 и R1 не оказывало дополнительного эффекта на активность генов.

Клетки T98G и T2, сохранившиеся после воздействия 100 мкг/мл ФМ и однократно пересеянные, представляли собой сочетание двух популяций — непролиферирующих переживающих клеток и пролиферирующих клеток. Экспрессия большинства генов в этих клетках оказалась существенно увеличенной. В клетках глиобластомы T98G было выявлено усиление активности генов *FGF2(b)*, *HGF*, *FAP*, *THBS1* и *TNC*, а в клетках линии T2 — генов *VEGF*, *FAP* и *TNC* (рис. 6, б). Увеличение дозы препарата до 300 мкг/мл приводило к доминированию в популяции непролиферирующих переживающих клеток и сопровождалось дальнейшим усилением экспрессии генов. Наиболее выраженной оказалась активация генов *FAP* и *TNC*, по уровню которых клетки T98G и T2 более всего отличались от клеток линий A172 и R1. Кроме того, в переживающих клетках T98G многократно выросла экспрессия генов *HGF* и *THBS1*, а в клетках T2 — гена *VEGF*. Активность остальных генов была также в разной степени увеличена (рис. 6, в). При повторном воздействии ФМ на резистентные клетки линий T98G и T2 наблюдали нарастание экспрессии генов в зависимости от снижения численности пролиферирующих клеток и преобладания переживающих клеток.

Таким образом, в линиях глиобластом T98G и T2 при однократном и повторном воздействии ФМ сохранялись популяции переживающих клеток, которые обладали повышенной по сравнению с исходной популяцией активностью генов ростовых факторов, белков межклеточного матрикса, а также генов, ассоциированных с мезенхимным фенотипом.

Обсуждение

В настоящей работе приведены результаты изучения действия ФМ на клетки линий глиобластом A172 и T98G, которые широко используются для тестирования противоопухолевых препаратов, а также на клетки новых линий глиобластом R1 и T2.

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 отличие от этого в линиях T98G и T2 после действия ФМ выявлялись две популяции — пролиферирующих и переживающих непролиферирующих клеток. По мере увеличения дозы ФМ пролиферирующие клетки погибали, а переживающие непролиферирующие клетки сохранялись на протяжении длительного срока.

В клетках A172 и R1 большинство исследованных генов исходно были более активны, чем в клетках T98G и T2. После воздействия на клетки A172 и R1 ФМ в нелетальных дозах отмечали снижение активности этих генов. В клетках T98G и T2, наоборот, эффект ФМ выражался в увеличении экспрессии тех же генов. Увеличение дозы ФМ приводило к доминированию в культурах T98G и T2 непролиферирующих переживающих крупных одноядерных и многоядерных клеток и сопровождалось существенным увеличением активности всех изученных генов.

Впервые возможность формирования непролиферирующих многоядерных клеток под действием генотоксических воздействий была показана более 60 лет назад (Puck, Marcus, 1955, 1956). Тогда было продемонстрировано, что облучение клеток HeLa умеренными дозами радиации вызывает появление в популяции гигантских многоядерных клеток, которые делятся очень медленно или вовсе утрачивают эту способность, при этом они секретируют в среду факторы, поддерживающие клеточный рост. Благодаря способности секретировать ростовые факторы облученные клетки стали широко использоваться в качестве фидерного слоя. Появление в клеточной популяции после воздействия генотоксическими препаратами многоядерных клеток одно время приравнивали к клеточной гибели. Действительно, часть популяции многоядерных клеток элиминируется путем апоптоза или аутофагии. В то же время такие клетки могут выходить из состояния покоя и делиться, а образующиеся при этом клетки могут проявлять свойства, присущие стволовым клеткам (Gewirtz, 2009; Lagades et al., 2012; Zhang et al., 2014; Mirzayans et al., 2017). Наряду с индукцией образования многоядерных клеток генотоксические агенты могут провоцировать возникновение гигантских мононуклеарных клеток с крупными ядрами (Erenpreisa, Kalejs, 2001; Erenpreisa et al., 2005). Показано, что подобные клетки могут образовываться разными способами, включая эндоредупликацию и слияние ядер в многоядерных клетках.

В линиях глиобластом человека при действии облучения было описано формирование устойчивых субпопуляций непролиферирующих клеток (Kaur et al., 2015). Было обнаружено, что среди гетерогенной популяции клеток линий U87MG и SF268, а также нескольких первичных линий глиобластом присутствует небольшая часть мононуклеарных клеток, способных сливаться между собой с образованием многоядерных непролиферирующих клеток и в таком состоянии выдерживать летальные дозы радиации. Повреждающее действие радиации эти клетки преодолевали с помощью активации ключевой молекулы регуляции клеточного цикла pCdk1(Y15), ведущей к его аресту и усилению процессов репарации. При этом резистентные клетки характеризовались усилением экспрессии ряда цитокинов, таких как GM-CSF, IL-6 и IL-8. Известно, что цитокины и провоспалительные интерлейкины могут активировать пролиферацию и способствовать росту опухолей. Было высказано предположение о том, что многоядерные непролиферирующие клетки формируют популяцию, способную индуцировать возникновение рецидива заболевания.

Описанные в настоящем исследовании непролиферирующие популяции клеток T98G и T2 сохранялись в течение длительного времени, но не возобновляли пролиферативную активность. Эти клетки характеризовались многократным по сравнению с исходной клеточной популяцией усилением экспрессии ряда генов. ФМ индуцировал активацию генов основных проангиогенных факторов *VEGF* и *FGF2(b)*, а также генов ростовых факторов *HGF*, *EGF* и *TGFβ1*, являющихся полифункциональными молекулами, участвующими в процессах регуляции клеточного цикла, дифференцировки, морфогенеза и апоптоза, и играющих ключевую роль в канцерогенезе (Guarino, 2007; Lamouille et al., 2014). В этих же клетках нами отмечалось усиление экспрессии генов белков внеклеточного матрикса *THBS1* и *TNC*, являющихся компонентами метастатической ниши и связанных с процессами миграции и инвазии (Jayachandran et al., 2014; Brösicke, Faissner, 2015), а также гена транскрипционного фактора *Zeb1*. Его продукт *Zeb1* является одним из основных индукторов эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП) — процесса, участвующего в большинстве стадий инвазивно-метастатического каскада (Chou, Yang, 2015; Zhang et al., 2015). *HGF*, *EGF*, *TGFβ1* и молекулы внеклеточного матрикса, такие как *THBS1* и *TNC*, также могут выступать индукторами ЭМП. Кроме того, в клетках T98G и T2, обработанных ФМ, нами была отмечена активация ассоциированных с мезенхимным фенотипом генов *αSMA* и *FAP*.

В настоящее время получены данные, указывающие на то, что химиотерапия (Kubelt et al., 2015) и лучевая терапия (Mahabir et al., 2014) могут влиять на переход глиобластом к более агрессивному мезенхимному субтипу. Авторы этих работ делают вывод о том, что ЭМП вовлечен в прогрессию глиобластом, способствует усилению их гетерогенности и агрессивности, а общепринятые средства терапии заболевания оказывают влияние на этот процесс.

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что после действия ФМ в популяциях линий T98G и T2 выявляются клетки, устойчивые к препарату и активно продуцирующие молекулы-индукторы ЭМП. Полученные данные пока не позволяют решить вопрос о том, представляют ли переживающие клетки минорную по численности популяцию, которая имеется в интактной культуре, или она возникает в ответ на действие ФМ. Независимо от происхождения переживающих клеток именно в них выявлена высокая активность генов проангиогенных и ростовых факторов, а также ряда белков межклеточного матрикса, продукты которых могут оказывать существенное влияние на микроокружение опухоли и как следствие — на течение опухолевого процесса.

Дальнейшее изучение и характеристика отдельных клеточных популяций, формирующихся в ответ на действие противоопухолевых препаратов, а также исследование механизмов этого процесса могут способствовать созданию схем более эффективной, индивидуализированной терапии больных глиобластомами.

Авторы благодарят М. В. Филатова за предоставленные клеточные линии и И. В. Смирнова за помощь в оформлении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «Полигност».

Список литературы

- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартанян Н. Л., Пиневиц А. А., Самойлович М. П. 2016. Характеристика клеточных линий A172 и T98G. Цитология. 58 (5): 349—355. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Samoilovich M. P. 2016. Characteristics of A172 and T98G cell lines. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 10 (5): 341—348.)
- Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартанян Н. Л., Пиневиц А. А., Филатов М. В., Самойлович М. П. 2017. Характеристика новых клеточных линий глиобластом человека. Цитология. 59 (10): 669—675. (Kiseleva L. N., Kartashev A. V., Vartanyan N. L., Pinevich A. A., Filatov M. V., Samoilovich M. P. 2017. Characterization of new human glioblastoma cell lines. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya) (In press).)
- Agnihotri S., Gajadhar A. S., Ternamian C., Gorlia T., Diefes K. L., Mischel P. S., Kelly J., McGown G., Thorncroft M., Carlson B. L., Sarkaria J. N., Margison G. P., Aldape K., Hawkins C., Hegi M., Guha A. 2012. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. J. Clin. Invest. 122: 253—266.
- Beauchesne P. 2012. Fotemustine: a third-generation nitrosourea for the treatment of recurrent malignant gliomas. Cancers (Basel). 4: 77—87.
- Brösicke N., Faissner A. 2015. Role of tenascins in the ECM of gliomas. Cell Adh. Migr. 9: 131—140.
- Chou Y., Yang M. 2015. Epithelial-mesenchymal transition factors in solid tumor and hematological malignancy. J. Chin. Med. Assoc. 78: 438—445.
- Erenpreisa J., Kalejs M. 2001. Mitotic death: a mechanism of survival? A review. Cancer Cell Int. 1: 1—7.
- Erenpreisa J., Kalejs M., Cragg M. S. 2005. Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. Cell Biol. Int. 29: 1012—1018.
- Gewirtz D. A. 2009. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. Autophagy. 5: 1232—1234.
- Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Nat. Cancer Inst. 51: 1417—1423.
- Guarino M. 2007. Epithelial-mesenchymal transition and tumor invasion. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 2153—2160.
- Iwata K., Yung W. K., Fields W. S. 1988. In vitro effects of ACNU, BCNU, CDDP, and bleomycin on human glioma cells. Neurol. Med. Chir. (Tokyo). 28: 965—969.
- Jayachandran A., Anaka M., Prithviraj P., Hudson C., McKeown S. J., Lo P., Vella L. J., Goding C. R., Cebon J., Behren A. 2014. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. Oncotarget. 5: 5782—5794.
- Kaur E., Rajendra J., Jadhav Sh., Shridhar E., Goda J., Moiyadi A., Dutt Sh. 2015. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cell mediate their sustained survival and recurrence. Carcinogenesis. 36: 685—695.
- Kubelt C., Hattermann K., Sebens S., Mehdorn H. M., Held-Feindt J. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition in paired human primary and recurrent glioblastomas. Int. J. Oncol. 46: 2515—2525.
- Lagades C., Vlashi E., Della Donna L., Dekmezian C., Pajonk F. 2012. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. Stem Cells. 30: 833—844.
- Lamouille S., Xu J., Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15: 178—196.
- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. Methods. 25: 402—408.
- Mahabir R., Tanino M., Elmansuri A., Wang L., Kimura T., Itoh T., Ohba Y., Nishihara H., Shirato H., Tsuda M., Tanaka S. 2014. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. Neuro-Oncology. 16: 671—685.

Melendez B., Garcia-Claver A., Ruano Y., Campos-Martin Y., de Lope A. R., Perez-Magan E., Mur P., Torres S., Lorente M., Velasco G., Mollejo M. 2011. Copy number alterations in glioma cell lines. In: Glioma. Exploring its biology and practical relevance. Rijeka: InTech. 429—448.

Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Wang Y. W., Kumar P., Murray D. 2017. Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain viability and replicate their genome. *Int. J. Mol. Sci.* 18 : 360—375.

Puck T. T., Marcus P. I. 1955. A rapid method for viable cell titration and clonal production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 41 : 432—437.

Puck T. T., Marcus P. I. 1956. Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103 : 653—666.

Stein G. H. 1979. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G₁ arrest *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 99 : 43—54.

Yachi K., Watanabe T., Ohta T., Fukushima T., Yoshino A., Ogino A., Katayama Y., Nagase H. 2008. Relevance of MSP assay for the detection of MGMT promoter hypermethylation in glioblastomas. *Int. J. Oncol.* 33 : 469—475.

Zhang P., Sun Y., Ma L. 2015. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle.* 14 : 481—487.

Zhang S., Mercado-Uribe I., Xing Z., Sun B., Kuang J., Liu J. 2014. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploidy giant cells. *Oncogene.* 33 : 116—128.

Поступила 24 VIII 2017

FOTEMUSTINE EFFECT ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINES

L. N. Kiseleva,^{1,*} A. V. Kartashev,^{1,3} N. L. Vartanyan,¹ A. A. Pinevich,^{1,2} M. P. Samoilovich^{1,2}

¹ Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies named after I. M. Granov, St. Petersburg, 197758,

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, and

³ North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, St. Petersburg, 191015;

* e-mail: luba_kiseleva@mail.ru

Glioblastomas are heterogeneous group of tumors of neuroectodermal origin. Tumor cell cultures obtained from patients with glioblastomas differ in morphology, phenotype, as well as genetic characteristics. In the current work we used both glioblastoma cell cultures A172 and T98G (known from 70th of the XX century) and new lines of glioblastomas R1 and T2 (obtained in 2010 from surgical material of patients). The purpose of this study was to evaluate the effect of alkylating antitumor drug fotemustine (FM) after single and repeated exposure on survival and proliferation of these glioblastoma lines, as well as FM effect on the expression of several growth factor genes, extracellular matrix proteins genes, mesenchymal cell genes, and the transcription factor Zeb1. FM had different effect on A172 and R1 glioblastoma cell lines versus T98G and T2 cell lines. LD50 for A172 cells was 60 µg/ml, while for T98G cells it amounted 250 µg/ml. Single exposure of A172 and R1 cell lines to FM in a dose of 100 µg/ml resulted in death of all cells in culture. A172 and R1 cells exposure to sublethal doses of FM caused the decrease in activity of all studied genes. After incubation of T98G and T2 glioblastoma cells with FM in sublethal doses we identified two cell populations: proliferating cells and non-proliferating growth-arrested cells. Cell exposure to FM in doses over 300 µg/ml led to dominance of growth-arrested cells in populations. These cells remained viable for 1.5 months. The effect of FM on T98G and T2 cell lines was accompanied by increased activity of all studied genes. It was concluded that after exposure to FM a population of growth-arrested, drug-resistant cells is revealed in T98G and T2 cell cultures. These cells exhibit high expression of genes encoding factors associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). We discuss the possible impact of non-proliferating cells actively producing growth factors on the tumor microenvironment.

Key words: glioblastoma, A172, T98G, chloroethylnitrosourea, fotemustine, growth factor genes, extracellular matrix protein genes, Zeb1, growth-arrested cells.