

Соотношение рецепторов TrkA и p75 на клетках нейроэпителиальных опухолей – новая мишень воздействия комбинаций фактора роста нервов с цисплатином или темозоломидом

А.Н. Чернов

ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»;
Республика Беларусь, 220072 Минск, ул. Академическая, 28

Контакты: Александр Николаевич Чернов al.chernov@mail.ru

Цель работы — изучить экспрессию, соотношение TrkA- и p75-рецепторов на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы и установить их взаимосвязь с чувствительностью клеток опухолей к фактору роста нервов (ФРН) и его комбинациям с цисплатином или темозоломидом.

Материалы и методы. На первичных культурах клеток анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы изучены: 1) цитотоксический эффект ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом по определению индекса цитотоксичности; 2) изменение экспрессии и соотношения рецепторов TrkA и p75 методом иммунофлуоресценции; 3) корреляции между экспрессией, соотношением рецепторов TrkA, p75 и индексом цитотоксичности реагентов с помощью методов корреляционного анализа.

Результаты. Установлено, что экспрессия и соотношение рецепторов зависят от типа опухоли и механизма действия реагентов. Экспрессия и соотношение рецепторов TrkA и p75 взаимосвязаны с чувствительностью клеток анапластической астроцитомы и глиобластомы к ФРН и его комбинациям с цисплатином или темозоломидом.

Заключение. Соотносительная экспрессия рецепторов TrkA, p75 и коэффициент ее корреляции с индексом цитотоксичности указывают на механизм (сигнальный путь), по которому идет гибель клеток.

Ключевые слова: фактор роста нервов, комбинация фактора роста нервов с цисплатином или темозоломидом, рецепторы TrkA, p75, соотношение рецепторов, индекс цитотоксичности, корреляции

DOI: 10.17650/2222-1468-2016-6-4-53-61

The ratio of TrkA and p75 receptors on the cell neuroepithelial tumors – a new target effect of nerve growth factor with cisplatin and temozolomide and the combinations

A.N. Chernov

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus;
28 Akademicheskaya St., Minsk 220072, Republic of Belarus

Objective. To study the change of expression of TrkA, p75 receptors and their ratio on the human anaplastic astrocytoma, glioblastoma and medulloblastoma cells cultures exposed to nerve growth factor (NGF) and its combination with cisplatin or temozolomide, to establish participation of expression of the receptors in sensitivity tumor cells to NGF and its combinations with chemotherapeutical drugs.

Materials and methods. In primary cell cultures of anaplastic astrocytoma, glioblastoma and medulloblastoma were studied: 1) cytotoxicity effects of nerve growth factor and its combination with cisplatin or temozolomide; 2) the expression of TrkA, p75 receptors and the its ratio by immunofluorescence; 3) correlation between expression of TrkA, p75 receptors, the its ratio and index of cytotoxicity of reagents.

Results. It is found that the expression of the receptors and the relationship depends on the tumor type and reagents' mechanism of action. Expression of TrkA and p75 receptors and their ratio correlated with sensitivity of anaplastic astrocytoma and glioblastoma cells to NGF and its combination with cisplatin or temozolomide.

Conclusion. Relative expression of TrkA/p75 receptor, and its coefficient of correlation with index of cytotoxicity point to a mechanism (signaling pathway), on which there is cell death.

Key words: nerve growth factor, combination of nerve growth factor with cisplatin or temozolomide, TrkA, p75 receptors, the ratio receptors, index of cytotoxicity, correlations

Введение

В настоящее время злокачественные новообразования по показателям распространенности, инвалидизации и смертности вышли на 2-е место вслед за патологией сердечно-сосудистой системы [1]. У детей и подростков интракраниальные неоплазии по степени распространенности занимают 2-е место после лейкозов, представляя собой гетерогенную по гистологическим типам группу. К наиболее злокачественным опухолям относятся медуллобластомы, нейробластомы, глиобластомы и анапластические астроцитомы [2, 3]. Прогноз для этих пациентов крайне неблагоприятный. Общая 5-летняя выживаемость составляет менее 50–60 % после хирургического вмешательства, дополняемого химио- и лучевой терапией [4–6]. Общеизвестным фактом являются тяжелые токсические последствия химиотерапии на организм пациента. Это делает актуальным поиск новых подходов и стратегий лечения опухолей мозга: антиангиогенная, сонофотодинамическая и таргетная терапия [7, 8]. Последняя подразумевает исследование новых эффективных соединений, а также мишеней их воздействия на опухолевые клетки [7]. Среди таких соединений перспективным выглядит класс эндогенных биорегуляторов полифункциональной природы – ростовых факторов, которых к настоящему времени открыто более 80 [9]. Наиболее хорошо изучен фактор роста нервов (ФРН), способствующий выживаемости и развитию клеток центральной нервной системы, одновременно вызывающий ингибирование ангиогенеза, инвазии опухоли [10, 11]. Обнаружено, что ФРН обладает цитотоксическим противоопухолевым эффектом на культурах клеток интракраниальных неоплазий, который может усиливаться при комбинированном его применении с химиопрепаратами [9]. Поскольку химиотерапия опухолей мозга в клинике проводится с применением темозоломида и препаратов платиновой группы (цисплатина, карбоплатина и т.д.) [1, 4, 13, 14], то для сочетания с ФРН автором были выбраны указанные химиопрепараты. Доказано, что ФРН реализует свои эффекты на клетках через связывание с рецепторами – высокоаффинным тирозинкиназным TrkA и низкоаффинным, содержащим домен смерти p75 [11, 15, 16]. Экспрессия первого из этих рецепторов на нейробластомах является маркером благоприятного прогноза у пациентов с данной патологией, способствуя спонтанной регрессии опухоли в менее злокачественную ганглионеврому [11, 16–19].

Остается неизученным вопрос, могут ли рецепторы TrkA и p75 на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы являться мишенями воздействия комбинаций ФРН с цисплатином или темозоломидом.

Цель исследования – изучить экспрессию, соотношение рецепторов TrkA и p75 на клетках анапласти-

ческой астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы и установить их взаимосвязь с чувствительностью клеток опухолей к ФРН и его комбинациям с цисплатином или темозоломидом.

Материалы и методы

Пациенты. Исследование выполнено на 19 пациентах в возрасте от 1 до 16 лет (медиана 8 лет), страдающих анапластической астроцитомой ($n = 5$), глиобластомой ($n = 7$) и медуллобластомой ($n = 7$), находившихся на лечении в детском нейрохирургическом отделении Городской клинической больницы скорой медицинской помощи г. Минска в 2010–2012 гг.

Первичная культура клеток нейроэпителиальных опухолей. Поступавший из клиники в течение 1 ч материал в стерильных условиях ламинарного бокса (Lobconco, США) отмывали от крови, освобождали от соединительно-тканых элементов в растворе Хэнкса (Sigma-Aldrich, США), содержащем 4 % сульфат гентамицина (Белмедпрепараты, РБ), и механически измельчали до мелких частиц. Клетки подвергали 10-минутной ферментативной обработке смесью 0,25 % раствора трипсина и 0,02 % этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в соотношении 1:3 (Sigma-Aldrich, США) при температуре 37 °C. Действие фермента нейтрализовали внесением в чашки Петри с посевами 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Обработанный материал подсчитывали в камере Горяева (Минимед, Россия) 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 опухолей культивировали на протяжении 2 сут в стандартных условиях CO₂-инкубатора (Heracell, США) при температуре 37 °C, 95 % влажности и 5 % парциальном давлении CO₂ [20, 21].

Индекс цитотоксичности реагентов. На культурах опухолей тестировали цисплатин (Veropharm, Россия) в дозе $3,3 \times 10^{-6}$ М (1 мкг/мл), темозоломид (Orion Pharma, Финляндия) в дозе $10,3 \times 10^{-6}$ М (2 мкг/мл), 7S-форму рекомбинантного ФРН человека (Sigma-Aldrich, США) в дозе $8,8 \times 10^{-9}$ М (0,1 мкг/мл) и комбинации ФРН с 10-кратно сниженной концентрацией цисплатина или темозоломида (цисплатин – $3,3 \times 10^{-7}$ (0,1 мкг/мл), темозоломид – $10,3 \times 10^{-7}$ М (0,2 мкг/мл)). 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 NY-2E (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 312$ [12]. Оценку индекса цитотоксичности (ИЦ) тестируемых соединений проводили спустя 1 сут после

экспозиции опухолевых культур с реагентами. Для этого оценивали чувствительность образцов неоплазий к реагентам на основе изучения гибели клеток, визуализируемой по поглощению 0,2 % раствора трипанового синего (Alta Aesar, Германия) в камере Горяева. Из посевов удаляли среду, добавляли 1 мл 0,25 % трипсина с ЭДТА и инкубировали в течение 5 мин при температуре 37 °С. Клетки пипетировали, вносили 1–2 капли 0,2 % раствора трипанового синего и переносили 20 мкл суспензии в камеру Горяева.

Подсчитывали количество мертвых (окрашенных) и жизнеспособных (прозрачных) клеток в 15 больших квадратах по диагонали и определяли их соотношение [20]. Полученный эффект — степень подавления роста опухолевых клеток химиопрепаратом [22] — был выражен ИЦ:

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

где N % — ИЦ препаратов; Опыт — выживаемость клеток при действии химиопрепаратов, ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами; Контроль — выживаемость клеток в контроле [22].

Иммунофлуоресценция. Выявление рецепторов TrkA, p75 выполнено на первичных культурах, полученных от пациентов с анапластической астроцитомой, глиобластомой и медуллобластомой. В каждую чашку Петри по истечении 2 сут роста культур наносили ФРН либо его комбинацию с 10-кратно сниженными концентрациями цисплатина или темозоломида. Спустя 1 сут среду удаляли и посевы 5-кратно промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (145 мМ хлорида, 7,3 мМ гидрофосфата и 2,7 мМ дигидрофосфата натрия, pH = 7,2), содержащим 1 % бычьего сывороточного альбумина, 4 % козьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и 0,2 % тритона X-100. На образцы наносили первичные моноклональные антитела к рецепторам ФРН: Anti-TrkA (SAB4902032, Sigma-Aldrich, США) и Anti-p75 (Pan-NGFR, Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:100. Указанные антитела разводили ФСБ на 0,3 % тритоне X-100. Клетки с антителами инкубировали в течение 24 ч при температуре 4 °С. После 3-кратной промывки ФСБ культуры подвергали воздействию вторичных кроличьих FITC-конъюгированных антител Anti-Rabbit Ig-FITC (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:1000 и выдерживали в темноте на протяжении 2 ч при комнатной температуре [23]. После инкубации посевы 3 раза отмывали от избытка реагентов и просматривали под флуоресцентным микроскопом Leitz MPV-2 (Германия) с цифровой камерой Leica DC350F (Германия) с возбуждающим 330–390 нм и эмиссионным 455–700 нм фильтрами L2, экспозицией 690 мс, усилением G1 при увеличении объектива $\times 16$. Делали калибровку для данного объектива и переводили пиксели в микрометры. С помощью компьютерной программы ImageJ (версия 1.45g) оценивали:

1) процентное соотношение флуоресцирующих клеток к их общему количеству в 5 полях зрения для каждого образца;

2) интенсивность флуоресценции (пиксель/мкм²) в расчете на 1 клетку;

3) на основании ранее вычисленных показателей рассчитывали соотношение TrkA/p75-рецепторов.

Определяли корреляции между соотношением TrkA/p75-рецепторов и ИЦ ФРН, его комбинаций с химиопрепаратами на клетки опухолей. Проанализировано 800 посевов.

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили не менее чем в 3 (3–5) независимых повторях. Результаты представляли как среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего для выборки объема n ($M \pm m$). Для сравнения 2 групп с относительно большим объемом выборки ($n > 50$) по выраженности количественных признаков применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA one-way) и F -критерий (Фишера) [24]. Предварительно каждую выборку проверяли на нормальность (распределение Гаусса) по критерию Колмогорова–Смирнова/Лиллифора и на однородность дисперсий по F -критерию. Вариабельность признаков оценивали по величине стандартного квадратического отклонения (σ).

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа без повторений (ANOVA two-way) рассчитывали уровни значимости для зависимости экспрессии рецепторов TrkA, p75, их соотношения от типа опухоли, механизма действия ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами. Установление корреляционных зависимостей между 2 неродственными показателями в выборке, подчиняющейся нормальному распределению, осуществляли с использованием коэффициента ранговой корреляции Пирсона r [24, 25]. Статистическую значимость коэффициентов корреляции в выборках, подчиняющихся нормальному распределению, оценивали по критерию Стьюдента t [25, 24]. Статистическую значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Для проведения описательной статистики и оценки статистической значимости различий между 2 группами использовали программу StatPlus 2005 пакета Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе оценивали ИЦ реагентов и их комбинаций при воздействии на культуры опухолевых клеток. Для этого ИЦ ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами сравнивали с обособленным действием химиопрепаратов (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают, что цитотоксическое действие комбинации ФРН + цисплатин было выше ($p < 0,05$) индивидуального эффекта ФРН на культурах клеток анапластической астроцитомы и медуллоблас-

Таблица 1. Индекс цитотоксичности (%) химиопрепаратов, фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами при воздействии на клетки интракраниальных опухолей

Реагент	Индекс цитотоксичности, %		
	Анапластическая астроцитома	Глиобластома	Медуллобластома
Цисплатин	53,3 ± 6,4	46,9 ± 4,8	47,5 ± 5,1
Темозоломид	46,0 ± 5,4	40,0 ± 5,6	36,5 ± 3,3
Фактор роста нервов	55,8 ± 5,4	48,2 ± 4,7	37,4 ± 3,2
Фактор роста нервов + цисплатин	84,7 ± 3,6*	43,2 ± 4,2	47,3 ± 2,6*
Фактор роста нервов + темозоломид	52,4 ± 9,0	41,2 ± 6,4	52,2 ± 5,9*

*Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия индекса цитотоксичности комбинаций реагентов от обособленного действия фактора роста нервов.

томы. Противоопухолевый эффект комбинации ФРН + темозоломид был выше ($p < 0,05$) действия ФРН на клетках медуллобластомы. Эффективность ФРН была сопоставима с цитотоксическим действием химиопрепаратов на клетках всех тестируемых опухолей.

Аддитивный эффект комбинации реагентов на культурах неопластических клеток поставил вопросы: могут ли рецепторы ФРН – TrkA и p75 – являться мишенями комбинаций ростового фактора с химиопрепаратами? Как изменяется экспрессия рецепторов на опухолевых клетках при воздействии комбинаций ФРН с цисплатином или темозоломидом?

Определяли количество неопластических клеток, экспрессирующих рецепторы TrkA и p75 под воздействием ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом.

В целях изучения экспрессии TrkA- и p75-рецепторов и их соотношения на опухолевые клетки наносили антитела к рецепторам и реагенты, определяя интенсивность FITC-флуоресценции рецепторов в пересчете на 1 клетку (рис. 1, 2).

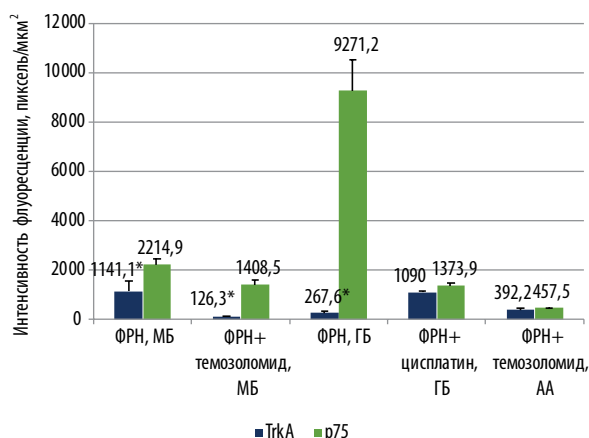


Рис. 1. Серии экспериментов, где в опухолевых клетках преобладала интенсивность FITC-флуоресценции антител к p75-рецепторам (группа «p75»). *Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия интенсивности флуоресценции TrkA-рецептора от p75 в пределах 1 серии

Анализ результатов позволил распределить серии экспериментов при воздействии ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом по 2 группам, в каждой из которых статистически значимо ($p < 0,05$) преобладала экспрессия рецепторов TrkA или p75 (см. рис. 1, 2).

К группе «p75» (см. рис. 1) были отнесены 5 серий опытов (в каждой из которых на клетки одного типа опухоли воздействовали одним из реагентов): при воздействии ФРН и комбинации ФРН + темозоломид – на клетки медуллобластомы; ФРН, комбинации ФРН + цисплатин – на клетки глиобластомы; ФРН + темозоломид – на клетки анапластической астроцитомы.

К группе «TrkA» (см. рис. 2) – 4 серии: при воздействии комбинации ФРН + цисплатин – на клетки медуллобластомы; комбинации ФРН + темозоломид – на клетки глиобластомы; ФРН, комбинации ФРН + цисплатин – на клетки анапластической астроцитомы.

Из рис. 1 и 2 видно, что экспрессия TrkA-рецептора в пределах каждой серии статистически значимо

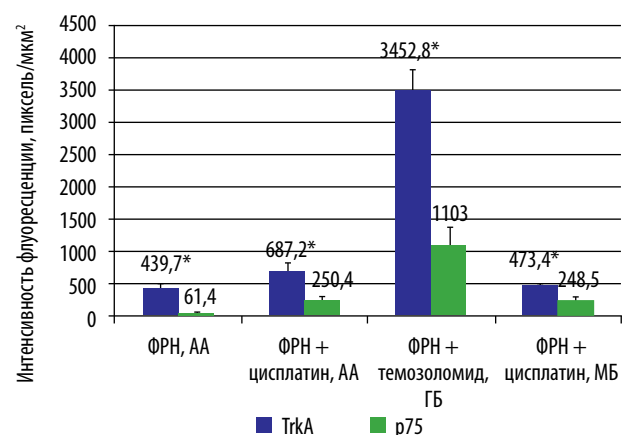


Рис. 2. Серии экспериментов, где в опухолевых клетках преобладала интенсивность FITC-флуоресценции антител к TrkA-рецепторам (группа «TrkA»). *Статистически значимые ($p < 0,05$) отличия интенсивности флуоресценции TrkA-рецептора от p75 в пределах 1 серии

Таблица 2. Зависимость экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения от механизма действия реагентов

Зависимость экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения	Реагент			
	все реагенты	фактор роста нервов	фактор роста нервов + цисплатин	фактор роста нервов + темозоломид
От типа опухоли, <i>p</i>	$2,0 \times 10^{-11}$ (90)	$0,0028$ (18)	$0,011$ (18)	$0,52$ (18)

Примечание. Здесь и в табл. 3: курсивом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$). В скобках — число степеней свободы для образцов опухолей пациентов, подвергнутых воздействию фактора роста нервов и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом.

Таблица 3. Зависимость экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения от типа опухоли

Зависимость экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения	Тип опухоли			
	все типы	анapластическая астроцитомы	глиобластома	медуллобластома
От механизма действия реагента, <i>p</i>	$1,1 \times 10^{-23}$ (90)	$0,00074$ (25)	$1,0 \times 10^{-18}$ (30)	$5,8 \times 10^{-9}$ (30)

($p < 0,05$) отличалась от таковой для рецептора p75. Исключение составили серии при применении комбинации ФРН + цисплатин на клетки глиобластомы и ФРН + темозоломид на клетки анапластической астроцитомы.

Следует обратить внимание на то, что в пределах 1 серии все пациенты с одним типом опухоли относились к одной группе («TrkA» или «p75»), т.е. для всех пациентов было характерно преобладание экспрессии одного типа рецепторов. Тогда как клетки тех же пациентов (с указанным типом опухоли) под действием другого реагента (в другой серии) проявляли доминирование другого типа рецепторов во всех случаях. Например, все исследуемые пациенты ($n = 7$), страдающие медуллобластомой, при воздействии ФРН и комбинации ФРН + темозоломид были отнесены к группе «p75», а при воздействии ФРН + цисплатин — к группе «TrkA». Такое доминирование того или иного типа рецепторов в каждой серии опытов связано с механизмом действия реагентов и зависит от типа опухоли. Необходимо отметить, что экспрессия p75-рецепторов статистически значимо ($p < 0,05$) отличалась от TrkA-рецепторов как внутри каждой из указанных групп («TrkA», «p75»), так и между ними (табл. 2, 3).

В группе «p75» преобладала экспрессия рецептора p75, которая была статистически значимо ($p = 0,001$) выше экспрессии в группе «TrkA», и наоборот.

Методом двухфакторного дисперсионного анализа установлена зависимость экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения от типа опухоли и механизма действия реагентов (см. табл. 2). Экспрессия рецепторов TrkA, p75 и их соотношение статистически значимо зависят от типа опухоли ($p = 2,0 \times 10^{-11}$) и механизма действия реагентов ($p = 1,1 \times 10^{-23}$). Зависимость от типа опухоли была установле-

на при действии ФРН и комбинации ФРН + цисплатин. Зависимость от механизма действия реагента была констатирована для всех рассматриваемых типов опухолей. Таким образом, зарегистрирована более сильная зависимость экспрессии TrkA-, p75-рецепторов от механизма действия реагента, чем от типа опухоли.

Изучали соотношение рецепторов TrkA/p75 на клетках опухолей (табл. 4).

Данные табл. 4 показывают, что в группах «TrkA» и «p75» значения интенсивности флуоресценции антител к TrkA- и p75-рецепторам, а также соотношение TrkA/p75 статистически значимо отличались как в своей группе, так и между группами ($p = 0,04$; $p = 0,0002$ и $p = 0,0004$ соответственно). Между группами были выявлены статистически значимые ($p = 0,03$) различия для величин, выражающих в процентном отношении разницу интенсивностей флуоресценции преобладающего над меньшим типами экспрессирующихся рецепторов (разница %), данный показатель был статистически значимо выше в группе «p75». При одинаковом уровне ИЦ в группах «TrkA» и «p75» этот факт свидетельствует о большей аффинности TrkA-рецептора и различиях в механизмах взаимного функционирования рецепторов. Он подтверждается показателями соотношения TrkA/p75-рецепторов, отличающимися между группами в 12,8 раза ($p = 0,0004$).

На основании анализа полученных результатов возник вопрос: существует ли взаимосвязь экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения (TrkA/p75) с чувствительностью клеток опухолей к ФРН и его комбинациям с цисплатином или темозоломидом? С этой целью автор рассчитывал коэффициент корреляции между ИЦ неопластических клеток пациентов, обработанных ФРН и его комбинациями с цисплатином или

Таблица 4. Интенсивность флуоресценции антител к TrkA- и p75-рецепторам, их соотношение и индекс цитотоксичности в группах пациентов с преобладанием TrkA- и p75-рецепторов*

Показатель	Группа «TrkA»		Группа «p75»		Уровень значимости между группами
Интенсивность флуоресценции к TrkA, пиксель/мкм ²	1379,9 ± 316,7	<i>p</i> внутри группы 0,01	616,2 ± 137,1	<i>p</i> внутри группы 0,0005	<i>p</i> = 0,04
Интенсивность флуоресценции к p75, пиксель/мкм ²	459,2 ± 153,4		3095,9 ± 652,7		<i>p</i> = 0,0002
Разница, %	842,4 ± 455,3		1587,9 ± 206,5		<i>p</i> = 0,03
Соотношение TrkA/p75	7,7 ± 0,2		0,6 ± 0,2		<i>p</i> = 0,0004
Индекс цитотоксичности, %	48,8 ± 3,5		45,4 ± 4,8		<i>p</i> = 0,39

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели (*p* < 0,05). Разница, % – это различие между преобладающим и меньшим значениями интенсивности флуоресценции в % в серии эксперимента, рассчитывали по формуле: ((экспрессия TrkA/экспрессия p75) × 100) – ((экспрессия p75/экспрессия TrkA) × 100) в серии, где преобладала экспрессия TrkA-рецептора, и ((экспрессия p75/экспрессия TrkA) × 100) – ((экспрессия TrkA/экспрессия p75) × 100) в серии, где преобладала экспрессия p75 рецептора.

*Приведены средние значения ± ошибка среднего, вычисляемые по данным всех пациентов (во всех сериях) в пределах 1 группы.

темозоломидом, и экспрессией TrkA-, p75-рецепторов, их соотношением.

В целях выявления механизмов действия ФРН и его комбинаций с химиопрепаратами в опухолевых клетках определяли изменение экспрессии TrkA-, p75-рецепторов относительно их экспрессии на клетках контрольных серий.

Статистически значимые корреляции экспрессии рецепторов TrkA и p75 с ИЦ реагентов выявлены для клеток анапластической астроцитомы и глиобластомы. В сериях опытов документировано наличие различных вариантов корреляций ИЦ с экспрессией рецепторов и их соотношением. Это свидетельствует о наличии различных механизмов действия реагентов, некоторые из которых можно установить путем сопоставления коэффициентов корреляций со значениями, отражающими в процентах экспрессию рецепторов TrkA и p75 по отношению к экспрессии рецепторов в контрольных сериях. Противоположные знаки коэффициентов корреляций TrkA- и p75-рецепторов с ИЦ документируют антагонизм действия указанных рецепторов по отношению к гибели клеток (табл. 5).

Например, на клетках анапластической астроцитомы при воздействии ФРН преобладала экспрессия TrkA-рецептора, при этом, как и в контрольной серии, была отмечена положительная корреляция (*p* < 0,05) ИЦ с соотношением TrkA/p75-рецепторов. Следовательно, цитотоксический эффект ФРН реализуется преимущественно через TrkA-рецепторы (см. табл. 4). Воздействие комбинации ФРН + цисплатин на клетки анапластической астроцитомы приводило к снижению экспрессии преобладающего в серии TrkA-рецептора по отношению к экспрессии рецептора p75 в сравнении с контрольной серией. Положительная (*p* < 0,0001) корреляция ИЦ с экспрессией p75-рецептора свидетельствует о наличии сигнального пути, запускаемого

через него (см. табл. 4). Механизм действия данной комбинации, проявляющийся значительным увеличением экспрессии p75-рецептора (при менее интенсивном росте TrkA), совпадает с механизмом гибели клеток опухоли через p75-рецепторы, что свидетельствует о потенциальной эффективности данной комбинации реагентов. На клетках анапластической астроцитомы при воздействии комбинации ФРН + темозоломид установлены положительные (*p* < 0,05) корреляции ИЦ с экспрессией TrkA-рецептора, соотношением TrkA/p75-рецепторов и отрицательная (*p* < 0,01) корреляция с экспрессией p75-рецептора, что свидетельствует о запуске гибели неопластических клеток в основном через TrkA-путь. Тогда как механизм действия комбинации ФРН + темозоломид, выраженный отсутствием преобладающего типа рецептора в соотношении (в отличие от контроля, где преобладает TrkA) и значительным ростом экспрессии p75-рецептора, препятствует ее эффективному цитотоксическому действию.

При воздействии ФРН на клетки глиобластомы установлена положительная корреляция (*p* < 0,02) ИЦ реагента с соотношением TrkA/p75-рецепторов и отрицательная (*p* < 0,0001) ИЦ реагента с экспрессией p75-рецептора, что указывает на запуск гибели клеток через TrkA-путь. Противоположные знаки корреляционных зависимостей указывают на антагонизм TrkA- и p75-рецепторов в гибели опухолевых клеток. Механизм действия ФРН в клетках глиобластомы характеризовался преобладанием экспрессии p75-рецептора (так же, как в контроле), уменьшением соотношения TrkA/p75 (по сравнению с контролем).

Экспрессия TrkA-рецептора статистически значимо не изменялась. Такой механизм действия ФРН препятствует гибели опухолевых клеток через TrkA-рецепторы. При воздействии комбинации ФРН +

Таблица 5. Коэффициент корреляции между экспрессией TrkA-, p75-рецепторов, их соотношением и индексом цитотоксичности реагентов при воздействии на клетки опухолей

Серия эксперимента	Число степеней свободы	Преобладающий тип рецептора в серии	Интенсивность флуоресценции антител к рецепторам по отношению к контрольной серии, %		Коэффициент корреляции с индексом цитотоксичности, r , уровень значимости, p		
			TrkA	p75	TrkA	p75	соотношение TrkA/p75
АА – контроль	54	TrkA (6,7)	100,0	100,0	—	—	—
АА – ФРН	54	TrkA (7,2)	112,9	106,4	0,13	–0,32	0,43 $p < 0,05$
АА – ФРН + ЦП	54	TrkA (2,7)*	176,4**	434**	–0,19	0,68 $p < 0,0001$	–0,20
АА – ФРН + ТД	54	Нет преобладания	100,7	792,9**	0,42 $p < 0,05$	–0,51 $p < 0,01$	0,46 $p < 0,05$
ГБ – контроль	68	p75 (20,8)	100,0	100,0	—	—	—
ГБ – ФРН	68	p75 (34,6)*	94,6	157,9**	0,27	–0,71 $p < 0,0001$	0,44 $p < 0,02$
ГБ – ФРН + ЦП	68	Нет преобладания	385,4**	23,4**	–0,65 $p < 0,0001$	–0,06	–0,47 $p < 0,02$
ГБ – ФРН + ТД	68	TrkA (3,1)	1221**	18,8**	0,50 $p < 0,001$	–0,53 $p < 0,001$	0,63 $p < 0,0001$
МБ – контроль	66	p75 (2,1)	100,0	100,0	—	—	—
МБ – ФРН	66	p75 (1,9)	117,4	110,3	0,12	–0,28	0,26
МБ – ФРН + ЦП	66	TrkA (1,9)	48,7**	12,4**	–0,04	–0,3	0,25
МБ – ФРН + ТД	66	p75 (11,2)*	13**	70,1	0,27	0,34	–0,01

Примечание. В скобках указаны значения экспрессии преобладающего типа рецептора по отношению к меньшему в каждой серии (количество преобладающего в соотношении типа рецепторов/количество рецепторов противоположного типа). Жирным шрифтом, символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$; $p < 0,01$) отличия значений экспрессии преобладающего рецептора по отношению к меньшему в каждой серии по сравнению с контролем. Интенсивность флуоресценции антител к рецепторам по отношению к контрольной серии, %, вычислялась по формуле: (экспрессия TrkA (или p75) под воздействием реагента/экспрессия TrkA (или p75) в контроле) $\times 100$. Условно интенсивность флуоресценции антител к TrkA- или p75-рецепторам в контрольных сериях для каждого типа опухоли принята за 100 %. Жирным шрифтом, символом ** обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия интенсивности флуоресценции антител к рецепторам по отношению к контрольной серии. Жирным шрифтом обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) коэффициенты корреляции индекса цитотоксичности с экспрессией TrkA- и p75-рецепторов и их соотношением. Знак прочерка в графах для корреляций в контрольных сериях указывает на то, что данные корреляции не рассчитаны, поскольку индекс цитотоксичности в контрольных посевах равен нулю. АА – анапластическая астроцитома; ФРН – фактор роста нервов; ЦП – цисплатин; ТД – темозоломид; ГБ – глиобластома; МБ – медуллобластома.

темозоломид на клетки глиобластомы выявлены положительные корреляции между ИЦ комбинации и экспрессией TrkA-рецептора ($p < 0,001$), соотношением TrkA/p75-рецепторов ($p < 0,001$) и отрицательная ($p < 0,0001$) корреляция между ИЦ комбинации и экспрессией p75-рецептора. Такие показатели констатируют активацию гибели клеток опухоли через TrkA-сигнальный путь. При этом механизм действия комбинации ФРН + темозоломид по своим показателям соответствовал установленным корреляционным зависимостям. Например, при положительной корреляции

между ИЦ и экспрессией TrkA-рецептора, соотношением TrkA/p75 в механизме действия наблюдали доминирование TrkA-рецептора над p75 (в отличие от контроля, где доминировал p75-рецептор), увеличение численности TrkA-рецептора (в 12 раз) по сравнению с контролем. При отрицательной корреляции между ИЦ и p75-рецептором его экспрессия была статистически значимо ингибирована (в 5 раз по отношению к контролю). Таким образом, комбинация ФРН + темозоломид обладает потенциальной противоопухолевой эффективностью.

При воздействии ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом на клетки медуллобластомы не было установлено статистически значимых корреляций экспрессии TrkA-, p75-рецепторов и их соотношения с ИЦ реагентов.

В сериях при воздействии ФРН и комбинации ФРН + темозоломид на клетки медуллобластомы преобладал рецептор p75. Применение ФРН стимулировало на неопластических клетках экспрессию p75 в большей степени, чем TrkA-рецептора, по отношению к контролю, при этом их численность становилась примерно одинаковой. Воздействие комбинации ФРН + темозоломид на клетки медуллобластомы приводило к статистически значимому ($p < 0,001$) ингибированию на них экспрессии TrkA-рецептора (в 7,5 раза) при незначительном подавлении экспрессии p75, что явилось причиной статистически значимого преобладания p75-рецептора на клетках опухоли по сравнению с контролем. При воздействии комбинации ФРН + цисплатин на клетки медуллобластомы преобладала ($p < 0,05$) экспрессия TrkA-рецепторов, явившаяся результатом стимулирования ($p < 0,01$) комбинацией синтеза молекул TrkA-рецептора и сильного ингибирования p75-рецептора на клетках опухоли. Вследствие наличия функционального антагонизма у данных рецепторов и более выраженного подавления экспрессии p75-рецептора, чем TrkA-рецептора (образующих структурные гетерокомплексы на мембранах клеток), p75-рецептор препятствует значительному увеличению численности TrkA и гибели клеток медуллобластомы через TrkA-сигнальный путь. Приведенные механизмы действия ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом на клетки медуллобластомы, отсутствие статистически значимых корреляций с ИЦ свидетельствуют о том, что гибель клеток осуществляется через альтернативные сигнальные пути.

Таким образом, установлены статистически значимые положительные и отрицательные корреляции между ИЦ реагентов и экспрессией TrkA-, p75-рецепторов, их соотношением (TrkA/p75) на клетках анапластической астроцитомы и глиобластомы. Различные варианты корреляционных зависимостей указывают на доминирование разных сигнальных каскадов, запускающих гибель опухолевых клеток. Среди них для исследованных типов опухолей преобладал TrkA-путь: при воздействии ФРН, комбинации ФРН + темозоломид на клетки анапластической астроцитомы и глиобластомы. Гибель клеток анапластической астроцитомы и глиобластомы через p75-рецепторы установлена при воздействии комбинации ФРН + цисплатин. На клетках медуллобластомы статистически значимых корреляций экспрессии указанных рецепторов с ИЦ не выявлено.

Во всех сериях экспериментов и на всех типах опухолей зарегистрирован функциональный антагонизм

экспрессии TrkA-, p75-рецепторов по отношению к гибели клеток (только в случае применения ФРН + цисплатин на клетках глиобластомы он маскируется экспрессией aberrантных TrkAIII-рецепторов). Соотношение TrkA/p75-рецепторов и коэффициент его корреляции с ИЦ документируют механизм (сигнальный каскад), по которому идет гибель клеток опухоли при воздействии ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом. На гибель опухолевых клеток также влияют тип доминирующего рецептора, его статус, описываемый соотношением TrkA/p75 (сверхэкспрессия, ингибирование или одинаковое количество), возможно формирование структурных гетерокомплексов рецепторов TrkA–p75 [26]. На наличие последнего факта указывают коэффициенты корреляций между ИЦ реагентов и экспрессией TrkA-, p75-рецепторов одного знака и соответствующие им функциональные изменения экспрессии рецепторов [27–31].

Выводы

Установлено присутствие TrkA- и p75-рецепторов на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы при воздействии на них ФРН и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом.

При воздействии любого из указанных реагентов на клетки опухоли наблюдали различия в экспрессии TrkA- и p75-рецепторов и их соотношения (в пересчете на 1 клетку) в пределах одного и различных типов опухолей.

В каждой серии эксперимента статистически значимо ($p = 0,001$) преобладала экспрессия TrkA- либо p75-рецептора, на основании чего сформированы группы «TrkA» и «p75». Экспрессия рецепторов TrkA и p75 также статистически значимо ($p = 0,03$) различалась между указанными группами.

Верифицирована зависимость экспрессии рецепторов TrkA, p75 от механизма действия реагента ($p = 1,1 \times 10^{-23}$) и от типа опухоли ($p = 2,0 \times 10^{-11}$).

Установлены статистически значимые ($p < 0,05$; $p < 0,0001$) положительные ($r = 0,42–0,68$; число степеней свободы 54–68) и отрицательные ($r = -0,42–(-0,71)$; число степеней свободы 54–68) корреляции между ИЦ ФРН, его комбинаций с цисплатином, темозоломидом и показателями экспрессии рецепторов TrkA, p75, их соотношением на клетках анапластической астроцитомы и глиобластомы. Различные варианты корреляционных зависимостей указывают на доминирование разных сигнальных каскадов (TrkA-, p75-пути), запускающих гибель опухолевых клеток при воздействии реагентов. Соотносительная экспрессия TrkA/p75-рецепторов и коэффициент ее корреляции с ИЦ указывают на механизм (сигнальный путь), по которому идет гибель клеток.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Grauer O., Pascher Ch., Hartmann Ch. et al. Temozolomide and 13-cis retinoic acid in patients with anaplastic gliomas: a prospective single-arm monocentric phase-II study (RNOP-05). *J Neurooncol* 2011;104(3):801–9.
2. Савва Н.Н., Зборовская А.А., Алейникова О.В. Злокачественные новообразования у детей Беларуси: заболеваемость, выживаемость, смертность, подходы к паллиативной помощи. Минск, 2008. 180 с. [Savva N.N., Zborovskaya A.A., Aleynikova O.V. Malignant tumors in children of Belarus: incidence, survival, mortality approaches to palliative care. Minsk, 2008. 180 p. (In Russ.)].
3. Lafai-Cousin L., Strother D. Current treatment approaches for infants with malignant central nervous system tumors. *Oncologist* 2009;14:433–44.
4. Конопля Н.Е. Лечение медуллобластомы у детей младше 4 лет. *Медицинский журнал* 2009;(1):112–4. [Konoplya N.E. Treatment of medulloblastoma in children younger than 4 years. *Meditsinskiy zhurnal* = Medical Journal 2009;(1):112–4. (In Russ.)].
5. Bobustuc G.C., Baker C.H., Limaye A. et al. Levetiracetam enhances p53-mediated MGMT inhibition and sensitizes glioblastoma cells to temozolomide. *Neurooncology* 2010;12(9):917–27.
6. Kokunai T., Iguchi H., Tamaki N. Differentiation and growth inhibition of glioma cells induced by transfer of trk A proto-oncogene. *J Neurooncol* 1999;42(1):23–34.
7. Борисов К.Е., Сакаева Д.Д. Таргетная терапия злокачественных глиом: состояние проблемы. *Российский онкологический журнал* 2011;(3):47–53. [Borisov K.E., Sakaeva D.D. Targeted therapy of malignant gliomas: state of the problem. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal* = Russian Oncological Journal 2011;(3):47–53. (In Russ.)].
8. Церковский Д.А. Соно-фотодинамическая терапия — новый метод лечения злокачественных опухолей мозга. *Онкологический журнал* 2015;9(1):94–106. [Tserkovskiy D.A. Sono-photodynamic therapy — a new method in the treatment of malignant brain tumors. *Onkologicheskii zhurnal* = Oncological Journal 2015;9(1):94–106. (In Russ.)].
9. Pimentel E. Handbook of growth factors. In 3 vol. London, Tokyo: CRC Press Inc, 1994. Vol. 2, Ch. 5: Neurotrophic growth factors. Pp. 217–40.
10. Калюнов В.Н. Биология фактора роста нервной ткани. Минск: Наука и техника, 1986. 206 с. [Kalyunov V.N. Biology of the growth factor of nervous tissue. Minsk: Nauka i tekhnika, 1986. 206 p. (In Russ.)].
11. Tacconelli A., Farina A.R., Cappabianca L. et al. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2004;6(4):347–60.
12. Чернов А.Н., Талабаев М.В., Конопля Н.Е. и др. Влияние химиопрепаратов и фактора роста нервов на выживаемость клеток первичной культуры нейроэпителиальных опухолей. *Вестник Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук* 2013;(1):46–51. [Chernov A.N., Talabaev M.V., Konoplya N.E. et al. Action of the nerve growth factor and chemotherapeutic drugs upon the viability of the cells of the neuroepithelial tumor primary culture. *Vestnik Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk* = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Series of Medical Sciences 2013;(1):46–51. (In Russ.)].
13. Чу Э., де Вита В. мл. Химиотерапия злокачественных опухолей. М.: Практика, 2008. 447 с. [Chu E., de Vita V. Jr. Chemotherapy of malignant tumors. Moscow: Praktika, 2008. 447 p. (In Russ.)].
14. Wolff J.E., Kortmann R.-D., Wolff B. et al. High-dose methotrexate for pediatric high grade glioma — results of the HIT-GBM-D pilot study. *J Neurooncol* 2011;102(3):433–42.
15. Korade M.Z., Yan C., Portugal C. et al. Expression and p75 neurotrophin receptor dependence of cholesterol synthetic enzymes in adult mouse brain. *Neurobiol Aging* 2007;28(10):1522–31.
16. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Let* 2001;169(2):107–14.
17. Brodeur G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev* 2003;3(3):203–15.
18. Brodeur G.M., Nakagawara A., Yamashiro D.J. et al. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol* 1997;31(1):249–56.
19. Harel L., Costa B., Fainzilber M. On the death Trk. *Dev Neurobiol* 2010;70(5):298–303.
20. Божкова В.П., Вепринцев Б.П., Викторов И.В. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы. М.: Наука, 1988. 318 с. [Bozhkova V.P., Veprintsev B.P., Viktorov I.V. et al. Guidance for cultivation of nervous tissue. Methods. Technics. Problems. Moscow: Nauka, 1988. 318 p. (In Russ.)].
21. Freshney R.I. Animal Cell Culture: a Practical Approach. Eds. by: W. Masters 3rd. London: Oxford University Press, 2000. 315 p.
22. Миронов А.Н., Бабаян Н.Д., Васильева А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических испытаний лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Mironov A.N., Babayan N.D., Vasil'eva A.N. et al. Guidance for the testing of pre-clinical investigation of medicinal drugs. P. 1. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.)].
23. Ghinelli E., Johansson J., Rios J.D. et al. Presence and localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in rat lacrimal gland. *Inv Ophthalmol Visual Sci* 2003;44(8):3352–7.
24. van Belle G., Fisher L.D., Heagerty P.J. et al. Biostatistics: a methodology for the health sciences. Canada: John Wiley and Sons Inc, 2004. 889 p.
25. Гланц С. Медицинская и биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 356 с. [Glants S. Medical and biological statistics. Moscow: Praktika, 1999. 356 p. (In Russ.)].
26. Krüttgen A., Schneider I., Weis J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 2006;16(4):304–10.
27. Chen J., Zhe X. Cotransfection of TrkA and p75NTR in neuroblastoma cell line IMR-32 promotes differentiation and apoptosis of tumor cells. *Chin Med J* 2003;116(6):906–12.
28. Evangelopoulos M.E., Weis J., Krüttgen A. Neurotrophin effects on neuroblastoma cells: correlation with Trk and p75NTR expression and influence of TrkA receptor bodies. *J Neurooncol* 2004;66(1–2):101–10.
29. Heymach J.V., Shooter E.M. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells. *J Biol Chem* 1995;270(20):12297–304.
30. Pflug B.R., Colangelo A.M., Tornatore C. et al. TrkA induces differentiation but not apoptosis in C6–2B glioma cells. *J Neurosci Res* 2001;64(6):636–45.
31. Wadhwa S., Nag T.C., Jindal A. et al. Expression of the neurotrophin receptors TrkA and TrkB in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci* 2003;28(2):181–8.