

На правах рукописи

ЧЕРНОВ

Александр Николаевич

**ЭФФЕКТЫ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ И ПЕПТИДОВ ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА, А ТАКЖЕ ИХ КОМБИНАЦИЙ С ХИМИОПРЕПАРАТАМИ,
НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА *IN VITRO***

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в отделе общей патологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент,
член-корреспондент РАН

Шамова Ольга Валерьевна

Официальные оппоненты:

Аругюнян Александр Варганович – доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»

Мацко Марина Витальевна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник научного отдела, врач-онколог Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский проспект, д. 69/71

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12. или на сайте <https://iemsph.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент

Алешина Г.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Онкологические заболевания представляют серьезную социально-экономическую проблему (Мерабишвили В.М., 2015; Globocan, 2020). По материалам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международного агентства по изучению рака – Globocan в мире в 2020 г. зарегистрировано 19292789 новых случаев заболеваний раком, из которых 9958133 случаев закончились летальным исходом (51,6%) (Globocan, 2020). По официальной статистике в Российской Федерации заболеваемость первичными опухолями центральной нервной системы в 2020 г. составила 5,3 случая на 100 тыс. населения (Globocan, 2020). Особенно актуальной является проблема борьбы с опухолевыми заболеваниями у детей. К наиболее частым злокачественным интракраниальным новообразованиям у детей относятся медуллобластомы и нейробластомы (Vigheron C., 2015). Прогноз у данной категории пациентов неблагоприятен. Пятилетняя выживаемость их составляет менее 50–60% при хирургическом удалении, последующей лучевой и интенсивной химиотерапии (Girardi F. et al., 2019).

Вследствие существующей опасности повреждения жизненно важных центров или диффузного характера роста интракраниальных опухолей, их оперативное вмешательство не всегда возможно, что делает актуальным совершенствование методов лучевой и химиотерапии. На сегодняшний день наиболее эффективными для лечения интракраниальных опухолей у детей и взрослых используются следующие химиопрепараты: темозоломид (TMZ), цисплатин (CSP), карбоплатин, этопозид, метотрексат, цитарабин, винкристин, циклофосфамид и доксорубин (Wolff J. E. et al. 2011; Penas-Prado M. et al., 2015; Buckner J. C. et al. 2016). Однако, применение химиотерапии сопровождается рядом проблем: 1) слабая проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для химиопрепаратов (Pardridge W. M., 2012); 2) их высокая цитотоксичность и неселективность действия, в результате которого гибнут не только опухолевые, но и нормальные высокопролиферирующие клетки (эпителиоциты и клетки красного костного мозга), что приводит к существенному ухудшению состояния здоровья пациентов; 3) множественная лекарственная устойчивость опухолевых и стволовых клеток злокачественных опухолей, что часто приводит к их метастазам и рецидивам у пролеченных пациентов (Oliver L. et al., 2020). В связи с этим возникает острая необходимость поиска новых соединений, проявляющих селективную противоопухолевую активность в отношении опухолевых клеток и не повреждающих здоровые ткани организма.

Новым концептуальным подходом в терапии онкозаболеваний является использование эндогенных регуляторных белков – ростовых факторов и катионных антимикробных пептидов (АМП) системы врожденного иммунитета человека или их комбинаций с химиопрепаратами.

Степень разработанности темы. К настоящему времени описано более 160 ростовых факторов (Cora S. et al., 2018). Из них фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) входящий в семейство нейротрофинов, представляет наибольший интерес для терапии заболеваний нервной системы. NGF связывается с двумя рецепторами: p75 и TrkA (Cohen S. et al., 1954, Калюнов В. Н., 1986). Рецептор p75 (Nerve Growth Factor Receptor, NGFR) является низкоаффинным рецептором для всех нейтрофинов (NGF, BDNF, NT3, NT4). Нейротрофная рецепторная тирозинкиназа 1 (NTRK1 или TrkA) представляет собой высокоаффинный рецептор NGF. Взаимодействие NGF с рецептором TrkA способствует выживаемости, поддержанию и дифференцировке симпатических холинэргических нейронов и глиальных клеток. В то же время NGF, связываясь с рецептором p75, индуцирует апоптоз клеток (Niederhauser O. et al., 2000; Deppmann C.D. et al., 2008). Установлены и

противоопухолевые эффекты NGF в отношении некоторых типов опухолей. Например, к таким эффектам относятся ингибирование NGF ангиогенеза и инвазии нейробластомы (Taconelli A. et al., 2004). Интересно, что экспрессия TrkA рецептора на клетках нейробластомы служит благоприятным прогностическим маркером исхода заболевания и предпосылкой к ее спонтанной регрессии (Lebedev T. D. et al., 2015). Изменение же соотношения TrkA/p75 рецепторов на клетках феохромоцитомы PC12 предопределяет их чувствительность к доксорубину и цисплатину (Bassili M. et al., 2010). Между тем, не изученным остается характер действия NGF, его комбинаций с химиопрепаратами, а также взаимосвязь этих эффектов с экспрессией TrkA, p75 рецепторов и их соотношением на клетках интракраниальных опухолей у детей. Также в литературе нет сведений о типах гибели клеток интракраниальных опухолей при действии комбинаций NGF с химиопрепаратами.

На сегодняшний день известно более 5000 АМП (Zhao X., 2013). Большинство АМП – это молекулы, состоящие из 12–50 аминокислот с высоким содержанием аргинина и/или лизина. Хотя первоначально пептиды были названы антимикробными, как соединения, обладающие антибиотической активностью в отношении бактерий, одноклеточных грибов, простейших и вирусов, как оказалось, многие АМП обладают иммуномодулирующим, ранозаживляющим действием, в то время как некоторые пептиды – противоопухолевой активностью (Do N., 2014). Пептиды имеют различные структуры, наличие и выраженность того или иного эффекта зависит от структурных особенностей каждого пептида. Некоторые АМП проявляют высокую цитотоксическую активность против неопластических клеток, резистентных к применяемым химиопрепаратам. Для изучения механизмов противоопухолевого действия нами были выбраны два пептида с различной структурой из семейства кателицидинов: кателицидин LL-37 с α -спиральной структурой, содержащийся в нейтрофилах и в ряде других защитных клетках человека и протегрин-1 (PG-1) – пептид с конформацией β -шпильки из нейтрофилов свиньи. В высоких концентрациях, эти пептиды являются токсичными для клеток человека (Wang L. et al., 2017), что создает препятствие для их внедрения в медицинскую практику. Одним из путей решения этой проблемы может быть поиск путей снижения эффективной концентрации LL-37 и PG-1. Снижение эффективной концентрации, в свою очередь, может быть достигнуто комбинированным применением LL-37 и PG-1 с веществами, обладающими синергичным действием с данными кателицидинами. В частности, актуальным является поиск комбинаций АМП с ростовыми факторами или химиопрепаратами, обладающих цитотоксической активностью против клеток опухолей головного мозга.

Экспрессия онкогенов семейства *MYC* (*MYCC*, *MYCN*) ассоциирована с активацией пролиферации, репликации ДНК, трансформации клеток медуллобластомы (МБ) и нейробластомы (Woo C.W. et al., 2004; von Bueren A. O. et al., 2011). Установлено, что экспрессия *MYCC*-онкогена изменяет чувствительность перевиваемых клонов D341, D425 МБ к химиопрепаратам (von Bueren A. O. et al., 2011). В научной литературе нет сведений о действии NGF на численность копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов в клетках МБ. Проведение такого исследования позволит использовать NGF для повышения чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Для повышения эффективности химиотерапии перспективными являются исследования, направленные на выявление потенциальных диагностических и прогностических маркеров интракраниальных опухолей. В качестве таких возможных маркеров могут рассматриваться интерлейкины семейства цитокинов, обладающие провоспалительными эффектами. Известно, что уровень секреции интерлейкина-6 (IL-6) клетками множественной лейкемии, почечной аденокарциномы, рака предстательной,

молочной желез, желудка, легкого связан с агрессивностью заболеваний и развитием устойчивости их клеток к химиопрепаратам (Yan H. Q. et al., 2014; Wang Y. et al., 2010). Проведение исследования на клетках интракраниальных опухолей позволит установить роль IL-6 в качестве потенциального маркера их злокачественности и резистентности к химиопрепаратам.

Исследования, приведенные в настоящей работе, актуальны, поскольку углубление представлений о механизмах действия NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами на клетки опухолей мозга позволит выявить новые возможности коррекции патологических процессов, и в перспективе снизить негативное цитотоксическое действие химиопрепаратов на здоровые клетки организма человека, а также создать новые схемы лечения онкологических заболеваний.

Таким образом, **целью работы** являлось изучение влияния фактора роста нервов, пептидов семейства кателицидинов (LL-37, PG-1) и химиопрепаратов и их комбинаций на клетки опухолей головного мозга (глиомы C6, U251, пилоцитарная астроцитома, анапластическая астроцитома, глиобластома и медуллобластома) *in vitro*.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить цитотоксическую активность NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами в отношении клеток глиом C6, U251, пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека *in vitro*.
2. Охарактеризовать *in vitro* действие NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека.
3. Изучить типы гибели клеток глиомы U251, пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы при *in vitro* действии NGF, PG-1, LL-37, цисплатина, темозоломида, этопозида и их комбинаций.
4. Провести анализ, направленный на выявление корреляционных связей чувствительности, степени злокачественности клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы и медуллобластомы с уровнем секреции IL-6 в среде при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF.
5. Исследовать экспрессию рецепторов TrkA, p75 и их соотношение на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы, установить их взаимосвязь с чувствительностью клеток опухолей к NGF, его комбинациям с цисплатином или темозоломидом.
6. Оценить изменение количества копий онкогенов (*MYC*, *MYCN*) в клетках медуллобластомы при *in vitro* действии NGF.

Научная новизна. Впервые установлено, что NGF, LL-37 и PG-1 проявляют высокую цитотоксичность по отношению к культивируемым клеткам глиом C6, U251, а также NGF обладает высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам ПА, АА, ГБ и МБ человека, в большинстве случаев, превышающую цитотоксическую активность исследованных химиопрепаратов.

Впервые охарактеризован тип гибели (апоптоз, некроз) клеток пилоцитарной астроцитомы, медуллобластомы и глиомы U251 человека при сочетанном действии NGF с цисплатином или темозоломидом, а также комбинации PG-1 с этопозидом.

Впервые показано, что добавление NGF к химиопрепаратам снижает их цитотоксический эффект на клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека.

Впервые показано, что уровень секреции IL-6 клетками ПА, эпендимомы, АА, ГБ и МБ коррелирует со степенью злокачественности опухолей. Установлена взаимосвязь между уровнем IL-6 и чувствительностью клеток высокозлокачественных (АА, ГБ, МБ) опухолей к химиопрепаратам и NGF.

Впервые продемонстрировано, что чувствительность клеток АА и ГБ к комбинациям NGF с цисплатином или темозоломидом предопределяется соотносительной экспрессией рецепторов TrkA/p75, что позволяет рассматривать данный показатель в качестве маркера ответа клеток АА, ГБ на действие комбинаций NGF с цисплатином или темозоломидом.

Впервые показано, что в результате действия NGF наблюдается уменьшение численности клеток МБ, содержащих аномально повышенное количество копий *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов и повышение количества опухолевых клеток, содержащих диплоидный набор копий генов *MYCC* и *MYCN*, что позволяет рассматривать число копий *MYCC*-онкогена в геноме в качестве маркера резистентности МБ к NGF и химиотерапии.

Теоретическая и практическая значимость работы. На опухолевых клетках исследованы эффекты соединений, относящихся к совершенно разным группам биологически активных молекул – NGF, относящегося к семейству нейротрофинов и пептидов, проявляющих антимикробные свойства. Установлено, что кроме известных видов активности эти соединения не только могут вызывать гибель опухолевых клеток, но и усиливать противоопухолевые свойства друг друга, а также и действия целого спектра химиопрепаратов. Получены новые данные, расширяющие представления о роли NGF и пептидов врожденного иммунитета в противоопухолевой защите. Установлены пути клеточной гибели при воздействии NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиотерапевтическими препаратами на клетки С6, U251, ПА, АА, ГБ и МБ человека, а также ряд факторов (IL-6, TrkA/p75), являющихся маркерами эффективности противоопухолевого действия изученных веществ и их комбинаций. Результаты, показывающие прямое цитотоксическое действие NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций с химиопрепаратами на клетки С6, U251, ПА, АА, ГБ и МБ человека, являются первым этапом скрининга NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций в качестве кандидатов для доклинических испытаний. Результаты скрининга позволяют оптимизировать дальнейшие исследования по введению NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций с химиопрепаратами животным с перевиваемыми опухолями.

Полученные результаты показывают, что максимальный цитотоксический эффект на клетки пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы человека оказывает комбинация NGF с этопозидом, на клетки анапластической астроцитомы – комбинация NGF с цисплатином и на клетки глиобластомы – комбинация NGF с карбоплатином. Что может являться основой для создания новых схем лечения данных опухолей у животных и человека. Также полученные результаты показывают, что при химиотерапии опухолей можно вводить NGF в качестве хемопротектора.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач были использованы: МТТ тест и окрашивание трипановым синим для оценки *in vitro* цитотоксической активности NGF, PG-1, LL-37, их комбинаций с химиопрепаратами; проточная цитометрия и электронная микроскопия для определения типов гибели опухолевых клеток; иммуноферментный анализ – для определения уровня ИЛ-6 в среде клеток; спектрофотометрический анализ – для оценки активности каспазы-3 в лизатах клеток; иммунофлуоресценция – для оценки экспрессии рецепторов TrkA и p75, а также их соотношения TrkA/p75 на клетках опухолей мозга; флуоресцентная *in situ* гибридизация – для идентификации числа копий *MYCC*, *MYCN* онкогенов в МБ, а также культивирование перевиваемых клеток (глиомы крысы С6 и человека U251) и первичных клеток интракраниальных опухолей (ПА, АА, ГБ и МБ) и нейроглиальной ткани мозга человека. Статистический анализ выполняли с помощью программного пакета Statistica (версия 6.0) и включал однофакторный (ANOVA one-way), двухфакторный (ANOVA two-way) дисперсионный анализ и F-критерий (Фишера).

Положения диссертации, выносимые на защиту.

1. NGF, кателицидин LL-37 человека и протегрин-1 свиньи проявляют выраженную цитотоксическую активность, превосходящую активность химиопрепаратов, в отношении клеток глиом C6 и U251 *in vitro*. Цитотоксическая активность NGF сопоставима с действием химиопрепаратов на клетки пилоцитарной астроцитомы и анапластической астроцитомы и превышает по эффективности действие химиопрепаратов на клетки глиобластомы и медуллобластомы *in vitro*.

2. Для комбинаций PG-1 с карбоплатином, доксорубицином, цисплатином, этопозидом и LL-37 с этопозидом выявлен синергизм их цитотоксического *in vitro* действия на клетки глиом C6 и U251. Комбинированное действие NGF с химиопрепаратами проявляет активность, сопоставимую с действием NGF в отношении клеток пилоцитарной астроцитомы и анапластической астроцитомы, тогда как действие комбинаций было менее выражено по сравнению с действием NGF на клетках глиобластомы и более выражено по сравнению с действием NGF на клетках медуллобластомы *in vitro*.

3. Применение *in vitro* NGF оказывает действие, защищающее клетки здоровой нейроглиальной ткани мозга человека от повреждающего действия химиопрепаратов. При добавлении NGF к химиопрепаратам в семи из восьми комбинаций наблюдается действие, снижающее цитотоксический эффект химиопрепаратов в отношении нормальных клеток нейроглиальной ткани мозга человека.

4. Комбинация этопозиды и PG-1 оказывает *in vitro* синергическое цитотоксическое действие на клетки глиомы U251, выражающееся в увеличении доли клеток, гибнущих по апоптотическому пути и в результате некроза, по сравнению с индивидуальным воздействием PG-1 и этопозиды. При действии этопозиды повышается активность каспазы-3 в клетках U251 глиомы, подтверждая их гибель по пути апоптоза. В результате комбинирования NGF с цисплатином или темозоломидом наблюдается гибель клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы по смешанному типу или по пути некроза, в отличие от их гибели по пути апоптоза при индивидуальном применении указанных химиопрепаратов и NGF.

5. При культивировании клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы и медуллобластомы *in vitro* в течение 24 ч, концентрация IL-6 в культуральной среде положительно коррелирует со степенью злокачественности клеток, а также отрицательно коррелирует с чувствительностью клеток анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы к NGF и химиопрепаратам.

6. Соотносительная экспрессия TrkA/p75 рецепторов на клетках анапластической астроцитомы и глиобластомы положительно коррелирует с их чувствительностью к NGF и его комбинации с темозоломидом и отрицательно коррелирует с чувствительностью клеток глиобластомы к комбинации NGF с цисплатином.

7. В результате *in vitro* действия NGF на клетки медуллобластомы наблюдается увеличение доли клеток с диплоидным набором копий онкогенов *MYCN* и *MYCC* и снижение доли клеток с аномально повышенным количеством копий онкогенов, обладающих пониженной чувствительностью к NGF.

Личный вклад соискателя ученой степени. Личный вклад автора работы заключался в проведении экспериментов, анализе клинической информации и литературных сведений, статистической обработке и интерпретации, обобщении полученных данных и научной редакции рукописи. Исключение составил FISH анализ, выполненный для оценки численности копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов в МБ (выполнен на базе лаборатории цитогенетики РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск). Диссертантом осуществлялось также

написание статей и тезисов, либо принималось активное участие в подготовке соответствующих материалов.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности полученных в работе данных определяется достаточным и репрезентативным количеством экспериментального материала (n=98 пациентов с интракраниальными опухолями, 10 лиц у которых была взята нейроглиальная ткань мозга, 10389 посевов, 1020 аликвот и 417 электронограмм), применением адекватных методов исследования, в том числе методов статистического анализа. Диссертантом осуществлялось также написание статей и тезисов, либо принималось активное участие в подготовке соответствующих материалов.

Информация о внедрении результатов исследования. Информация о внедрении результатов исследования. Результаты работы защищены патентами Республики Беларусь № 15518 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения медуллобластомы у ребенка», № 15520 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения астроцитомы у ребенка», № 1563327 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения глиальной опухоли центральной нервной системы», № 16006 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или их комбинации для оптимизации лечения эпендимомы у ребенка», № 17256 «Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения атипичной тератоидной / рабдоидной опухоли человека», № 17752 «Способ определения чувствительности клеток нейробластомы человека к химиопрепарату или их комбинации химиопрепаратов». Результаты работы, в частности, «Способ оценки индивидуальной чувствительности клеток нейроэпителиальных опухолей человека к химиопрепаратам» внедрены в клиническую практику онкогематологического отделения для детей старшего возраста РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения РБ и в курс лекций кафедр детской онкологии и гематологии Белорусской медицинской академии последипломного образования и экологической и медицинской генетики по дисциплинам «стволовая клетка» и «цитология и гистология» Международного государственного экологического университета им. А. Д. Сахарова, а также кафедры биотехнологии по дисциплинам «молекулярная биология клетки» и «генотерапия» Полесского государственного университета. Проведение стратификации пациентов с медуллобластомой по группам риска, определяющим интенсивность и продолжительность химиотерапии на основе амплификации MYCC, MYCN-онкогенов FISH анализом внедрено в клиническую практику РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения РБ.

Информация о публикациях. По теме работы опубликовано 30 печатных работ: из них 12 статей в журналах, в том числе 3 статьи - в международных научных журналах на английском языке, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, 1 статья в журнале, индексируемом в базе данных Scopus. Также опубликованы: одна глава в коллективной монографии на английском языке, 2 статьи в сборниках конференций, 9 тезисов докладов и 6 патентов на изобретения Республики Беларусь.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 206 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и приложения; содержит 43 таблицы и 69 рисунков. Библиографический список включает перечень статей на русском (39) и английском (428) языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на клетках интракраниальных опухолей, взятых у 98 пациентов в возрасте от 3 мес до 17 лет ($8,3 \pm 0,6$ года), находившихся на лечении в Городской клинической больнице скорой медицинской помощи г. Минска в 2008–2013 гг. В исследование также включены 10 скоропостижно умерших человек в 2009 г. ($57,1 \pm 4,0$ лет), 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 получали сведения о гистологическом типе, степени злокачественности, локализации опухоли в отделах головного мозга, радикальности хирургического вмешательства, а также о возрасте и поле пациентов. Сведения позволили сформировать 5 исследовательских групп. В первую группу вошли 42 пациента с ПА (GrI, 22 мальчика и 20 девочек, $7,9 \pm 0,7$ года). Вторая группа включала 9 пациентов с АА (GrIII, 5 мальчиков и 4 девочки, $8,6 \pm 1,6$ года). Третья группа включала 9 пациентов с ГБ (GrIV, 9 мальчиков, $10,3 \pm 1,9$ года). Четвертая группа состояла из 38 детей с МБ (GrIV, 27 мальчиков и 11 девочек, $5,7 \pm 0,6$ года). В пятую группу вошли 10 скоропостижно умерших человек, у которых во время вскрытия были взяты фрагменты мозга (8 мужчин и 2 женщины, $57,1 \pm 4,0$ лет). Общее количество посевов $n=10389$, аликвот – 1020 и 417 электронограмм. Подбор концентраций химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37, их комбинаций, а также определение цитотоксической активности по расчету 50%-ной ингибирующей концентрации (ИК₅₀) и эффектов комбинаций выполнено на клеточных линиях глиом крысы С6 и U251 человека.

Клеточные культуры и условия культивирования. Клетки глиом крысы С6 и U251 человека культивировали в среде DMEM с 10%-ной ЭТС в CO₂-инкубаторе в течение 1-2 сут. Клетки нейроглиальной ткани выделяли из мозжечка скоропостижно умерших людей в течение 24 ч с момента смерти. Опухолевые клетки культивировали 2 сут (Freshney R. I. et al., 2000), клетки нейроглиальной ткани 28 сут (Gibbons H. M., 2010).

Оценка цитотоксического действия химиопрепаратов, фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на опухолевых и нормальных клетках мозга с использованием красителя трипанового синего в камере Горяева. Суспензию клеток смешивали с 0,4%-раствором красителя трипанового синего (Alta Aesar, Германия) и проводили подсчет жизнеспособных/погибших клеток в камере Горяева. Оценку цитотоксической активности химиопрепаратов, NGF, PG-1 и LL-37 рассчитывали, как индекс цитотоксичности (ИЦ), по формуле 1 (Миронов А. Н. и соавт., 2012):

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

где N% – ИЦ реагентов, опыт – выживаемость клеток при действии химиопрепаратов, NGF, PG-1 и LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами, контроль – выживаемость клеток в контроле.

Оценка цитотоксического действия фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37, химиопрепаратов и их комбинаций с помощью МТТ-теста. Цитотоксичность химиопрепаратов, NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций в отношении клеток глиом С6, U251 оценивали также с помощью МТТ-теста (Mosmann, 1983). В лунки 96-луночного планшета вносили по 10000 клеток. NGF, PG-1, LL-37, тестировали в 2-кратных, химиопрепараты в 2-10-кратных разведениях и инкубировали 1 сут в CO₂ инкубаторе. Спустя 1 сут добавляли по 25 мкл/лунку раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали 3 ч. Вносили 50

мкл/лунку изопропанола с 0,04 N HCl. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 540 нм на спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, США). Определяли цитотоксичность действующих веществ по формуле 2:

$$\text{ПК (\%)} = \frac{OD(\text{контроль}) - OD(\text{пробы})}{OD(\text{контроль}) - OD(0\% \text{ ЖК})} \times 100\%, \quad (2)$$

где, ПК (%) – процент погибших клеток в пробе, OD (пробы) – оптическая плотность пробы, содержащей исследуемый реагент или комбинацию в заданной концентрации; OD(контроль) – средняя оптическая плотность лунок с интактными клетками; OD (0% ЖК) – средняя оптическая плотность лунок с культуральной средой, не содержащей клеток.

Оценка по ИК₅₀ цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1, кателицидина LL-37 с химиопрепаратами и их эффектов на клетках глиом С6 и U251. ИК₅₀ комбинаций рассчитывали методом нелинейного регрессионного анализа с помощью программы OriginPro 8.5. ИК₅₀ химиопрепарата в каждой комбинации определяли исходя из пропорций по формуле 3: ИК₅₀ химиопрепарата = ИК₅₀ комбинации × W (3) где W – доля химиопрепарата в комбинации.

Рассчитав ИК₅₀, определяли по формуле 4 комбинационный индекс (КИ, CI) и типы эффектов комбинаций (синергизм, антагонизм, аддитивность) (Chou, T-C. et al., 2006):

$$CI = \frac{(D)1}{(Dx)1} + \frac{(D)2}{(Dx)2} \quad (4), \text{ где CI – комбинационный индекс, } D_1 \text{ и } D_2 \text{ – дозы ИК}_{50}, \text{ веществ}$$

1 и 2, вызывающих гибель клеток при обособленном применении; (Dx)₁ и (Dx)₂ – дозы ИК₅₀ эти веществ в комбинации.

Аддитивным считали эффект комбинации (ЭК) меньше суммы эффектов комбинантов, но больше эффекта более активного комбинанта: $A + B > ЭК$, но $AB > Э\text{max}(A \text{ или } B)$, где A и B – эффекты веществ при обособленном применении. Для аддитивизма КИ=1. Синергетическим считали эффект ЭК меньше суммарного эффекта равных по эффекту комбинантов, но больше, чем эффекты одного из веществ: $A \text{ или } B < ЭК$, но $AB < Э\Sigma(A + B)$, для синергизма КИ<1.

Снижением эффекта (антагонизм) считали ЭК меньше, чем эффект более активного комбинанта:

$ЭК_{AB} < Э\text{max}(A \text{ или } B)$, для антагонизма КИ>1.

Оценка жизнеспособности клеток глиомы U251 с помощью ДНК-связывающих красителей YO-PRO-1 и йодида пропидия методом проточной цитометрии. Для определения доли опухолевых клеток, погибающих по пути апоптоза или некроза при действии NGF, PG-1, LL-37 и их комбинаций с химиопрепаратами, клетки (1×10^6 /мл) окрашивали флуоресцентными ДНК-связывающими красителями YO-PRO-1 и йодидом пропидия (PI). Пробы и контроль инкубировали 1 сут в CO₂ инкубаторе. Затем к 100 мкл суспензии добавляли 5 мкл раствора YO-PRO-1 (Invitrogen, США) и 10 мкл раствора PI (Sigma-Aldrich, США). Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 мин в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) при помощи программы Kaluza™.

Оценка уровня секреции интерлейкина-6 опухолевыми клетками при действии химиопрепаратов и фактора роста нервов методом иммуноферментного анализа. Концентрацию IL-6 в культуральной среде определяли согласно инструкции по применению тест-набора для иммуноферментного анализа (BD Biosciences, США).

Спектрофотометрический метод определения активности каспазы 3. Активность каспазы-3 оценивали колориметрическим методом по скорости расщепления хромогенного

субстрата Ac-DEVD-pNA, используя набор «Caspase3 Assay Kit, Colorimetric» (Sigma, США). Клетки глиомы U251 (5 млн/мл) инкубировали с PG-1, этопозидом и их комбинацией 24 ч в CO₂ инкубаторе при 37°C, после чего получали их лизаты и определяли активность в них каспазы-3, измеряя OD проб при 405 нм.

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктурных особенностей типов гибели клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы при действии химиопрепаратов, фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами. Электронно-микроскопическое исследование выполнено согласно методике (Боголепов Н. Н., 1976) на эксплантах ПА и МБ, обработанных темозоломидом, цисплатином, NGF и его комбинациями с указанными препаратами. Материал, заключенный в аралдитовые капсулы, резали на ультрамикротоме LKB 2088 (Leitz, Швеция) и просматривали под электронным микроскопом JEM-100CX (JEOL Ltd., Япония) при увеличениях ×4800–14400. Определяли типы гибели клеток (апоптоз, некроз и смешанный тип) и соответствующие индексы (Сорока Н. Ф. и соавт., 2007). Количественный анализ клеток проводили с применением программы ImageJ.

Иммунофлуоресцентное определение экспрессии TrkA, p75 рецепторов и их соотношения на клетках анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы. Экспрессию TrkA, p75 рецепторов изучали на клетках АА, ГБ и МБ, предварительно обработанных NGF или его комбинациями с цисплатином или темозоломидом, при действии стократно разведенных первичных Anti-TrkA, Anti-p75 (Pan-NGFR) и тысячекратно разведенных вторичных кроличьих FITC-конъюгированных антител Anti-Rabbit Ig-FITC по протоколу (Farina A. et al., 2013). Клетки просматривали на флуоресцентном микроскопе Leitz MPV2 (Carl Zeiss, Германия). Применяя программу ImageJ, оценивали: интенсивность флуоресценции (пиксел/мкм²) в расчете на одну клетку и рассчитывали соотношение TrkA/p75-рецепторов. Определяли корреляции между экспрессией TrkA, p75-рецепторов, их соотношением TrkA/p75 и ИЦ реагентов.

Идентификация численности копий MYCC и MYCN- онкогенов в интерфазных клетках медуллобластомы с помощью флуоресцентной in situ гибридизации. Для выявления численности копий (амплификации) MYCC, MYCN-онкогенов в клетках МБ, наносили ДНК зонды VysisLSI MYCC (8q24.12-q24.13), VysisLSI MYCN (2p24), меченные флуорохромом SpectrumOrange (Zitterbart K. et al., 2011). Анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DMLB (Германия) с фильтром DAPI Texas SpectrumRed при увеличении объектива ×100.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ выполнен с помощью программного пакета Statistica (версия 6.0). Каждый опыт проводили не менее чем в трех (три–пять) независимых повторях. Результаты представляли в виде средней арифметической (M) и стандартного отклонения (SD). Для сравнения двух групп по выраженности количественных признаков применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA one-way) и F-критерий (Фишера). Методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA two-way) установлена зависимость экспрессии TrkA, p75 рецепторов и их соотношения от типа опухоли и механизма действия реагентов. В случае отклонения нормальности в независимых выборках и наличия малого количества образцов (n<30) для их сравнения использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимым считали различие при уровне значимости p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение цитотоксической активности фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 на клетках интракраниальных опухолей. Для определения цитотоксической противоопухолевой активности NGF, PG-1 и LL-37 в отношении клеток

глиомы С6 и U251 их действие сравнивали по ИК₅₀ с химиопрепаратами в МТТ тесте или, обрабатывая клетки витальным красителем трипановым синим (таблица 1).

Таблица 1. ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL-37, PG-1 при односуточном действии *in vitro* на клетки глиом С6 и U251 в МТТ-тесте и экспериментах с обработкой трипановым синим

Серия	Глиома С6		Глиома U251	
	ИК ₅₀ , мкМ, МТТ тест	ИК ₅₀ , мкМ, трипановый синий	ИК ₅₀ , мкМ, МТТ тест	ИК ₅₀ , мкМ, трипановый синий
Темозоломид	391,5	134,8	1725,7	1613
Цисплатин	81,2	82,2	371,5	228,9
NGF	0,0148	0,0025	0,00214	0,0035
LL-37	1,1	1,1	3,1	1,9
PG-1	10,1	8,6	26,1	10,5

Данные табл. 1 показывают, что наибольшей противоопухолевой активностью в отношении клеток глиомы С6 и U251 обладает NGF. Тогда как LL-37 и PG-1 также проявляют выраженное цитотоксическое действие, превосходящее по показателям эффекты цисплатина и темозоломида, как по результатам МТТ теста, так и при применении красителя трипанового синего. Клетки U251 оказались устойчивее к LL-37 в 2,9 раза и PG-1 в 2,6 раза в МТТ тесте и в 1,7 и 1,2 раза в тесте с трипановым синим. Кроме того, показатели ИК₅₀ NGF, PG-1 и LL-37 были ниже, чем ИК₅₀ доксорубина, карбоплатина и этопозид в отношении клеток глиомы С6 и U251 по результатам МТТ теста и при применении красителя трипанового синего (данные не показаны).

Также определяли цитотоксическое действие NGF на клетки ПА, АА, ГБ и МБ, сравнивая показатели с таковыми, характеризующими активность химиопрепаратов (табл. 2). Рассчитывали среднее значение ИЦ всех химиопрепаратов для каждого типа опухоли.

Таблица 2. Индекс цитотоксичности химиопрепаратов и NGF при *in vitro* действии на клетки интракраниальных опухолей

Серия эксперимента	Гистологический тип опухоли			
	пилоцитарная астроцитома	анапластическая астроцитома	глиобластома	медуллобластома
Винкристин	39,2±1,6	36,8±2,0*	38,1±3,3	37,8±0,6
Карбоплатин	46,6 ± 2,1	55,0 ± 3,6*	33,8 ± 3,3*	39,9± 1,7
Метотрексат	46,4 ± 1,8	29,7 ± 3,1*	43,2 ± 2,2	41,6 ± 1,6
Темозоломид	52,5 ± 2,2*	46,0 ± 4,7	33,6 ± 4,9	34,2 ± 2,3
Циклофосфамид	46,0±1,7	44,2±4,2	37,7±4,5	45,7±1,8
Цисплатин	51,0 ± 2,0*	44,0 ± 4,2	45,8 ± 2,9	47,3 ± 2,0*
Цитарабин	46,1 ± 1,8	45,3 ± 3,0	41,0± 3,0	41,1 ± 1,8
Этопозид	46,8 ± 1,6	49,7 ± 4,0*	51,1 ± 3,4*	39,2 ± 1,8
NGF	45,0 ± 1,6	45,9 ± 3,9	50,6 ± 2,8*	46,0 ± 1,7*
Среднее значение химиопрепаратов	45,4±0,03	41,8 ± 0,1	40,7± 0,3	38,4±0,08

Символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от среднего значения химиопрепаратов

Из данных таблицы 2 следует, что цитотоксическое действие NGF на клетки ГБ и МБ по показателям превышает ($p < 0,05$) действие химиопрепаратов. Цитотоксическое действие NGF на клетки ПА и АА не отличается ($p = 0,068$ и $p = 0,52$ соответственно) от действия химиопрепаратов.

Определение цитотоксической активности комбинаций фактора роста нервов, протегрина-1 и кателицидина LL-37 с химиопрепаратами на клетках интракраниальных опухолей. Проведен сравнительный анализ цитотоксической активности комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами в отношении клеток глиомы С6. Их эффекты сравнивали по ИК₅₀ с действием химиопрепаратов и пептидов в МТТ-тесте трипанового синего (табл. 3) и тесте с применением трипанового синего (данные не показаны).

Таблица 3. ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций при действии *in vitro* на клетки глиомы С6 в МТТ тесте

Серия	ИК ₅₀ реагентов	ИК ₅₀ PG1 + химиопрепараты	ИК ₅₀ LL37 + химиопрепараты	ИК ₅₀ NGF + химиопрепараты
Доксорубин	227,0	375,5	172,6	657,1
Карбоплатин	244,1	1144,4	55,2	2847,8
Темозоломид	391,5	1313,4	1805,1	5855,2
Цисплатин	81,2	644,7	4,0	1167,0
Этопозид	11,5	27,1	0,6	36,4
NGF	0,0148			
LL-37	1,1			
PG-1	10,1			

По данным МТТ теста (табл. 3) ИК₅₀ комбинаций LL-37 с доксорубицином, карбоплатином, цисплатином и этопозидом ниже (в 1,3, 4,4, 20,3 и 18,5 раз соответственно), чем ИК₅₀ химиопрепаратов, что указывает на более выраженную цитотоксическую активность данных комбинаций в отношении клеток глиомы С6 в сравнении с действием химиопрепаратов. Только для комбинации LL-37 с этопозидом ИК₅₀ оказалась ниже в 1,7 раза, чем ИК₅₀ кателицидина. Эта комбинация обладала наиболее выраженной цитотоксической активностью по сравнению с остальными сочетаниями. Аналогичные данные были получены для ИК₅₀ комбинаций NGF, LL-37, PG-1 с химиопрепаратами при действии на клетки глиомы С6 в тесте с трипановым синим (данные не показаны).

С целью определения цитотоксической активности комбинаций NGF, PG-1 и LL-37 с химиопрепаратами в отношении клеток глиомы U251 их действие сравнивали по ИК₅₀ с действием химиопрепаратов и пептидов в МТТ (табл. 4) и тесте с трипановым синим (данные не показаны).

Таблица 4. ИК₅₀ химиопрепаратов, NGF, LL-37, PG-1 и их комбинаций при действии *in vitro* на клетки глиомы U251 в МТТ-тесте

Серия	ИК ₅₀ реагентов	ИК ₅₀ PG1 + химиопрепараты	ИК ₅₀ LL37 + химиопрепараты	ИК ₅₀ NGF + химиопрепараты
Доксорубин	1554,9	730,9	5265,5	600,5
Карбоплатин	3652,9	2938,9	3513,3	2880,6
Темозоломид	1725,7	9761,7	4007,0	16804,0
Цисплатин	371,5	237,9	86,9	207,4
Этопозид	25,9	17,0	17,9	13,7
NGF	0,0214			
LL-37	3,1			
PG-1	26,1			

По данным МТТ теста (табл. 4) ИК₅₀ комбинаций PG-1 с доксорубицином (2,1 раза), карбоплатином (в 1,2 раза), цисплатином (в 1,6 раза) и этопозидом (в 1,5 раза), NGF с

доксорубицином (в 2,6 раза), карбоплатином (в 1,3 раз), цисплатином (в 1,8 раза) и этопозидом (в 1,9 раза), LL-37 с цисплатином (в 4,3 раза) и LL-37 с этопозидом (в 1,5 раз) была ниже, чем ИК₅₀ химиопрепаратов, что свидетельствует о более сильном цитотоксическом действии этих комбинаций по сравнению с химиопрепаратами. Аналогичные данные были получены для ИК₅₀ комбинаций NGF, LL-37, PG-1 с химиопрепаратами при действии на клетки глиомы U251 в тесте с трипановым синим (данные не показаны).

С помощью формулы 4 рассчитывали КИ и определяли эффекты комбинаций (синергизм, аддитивность) в отношении клеток глиомы С6 и U251 (рис. 1).

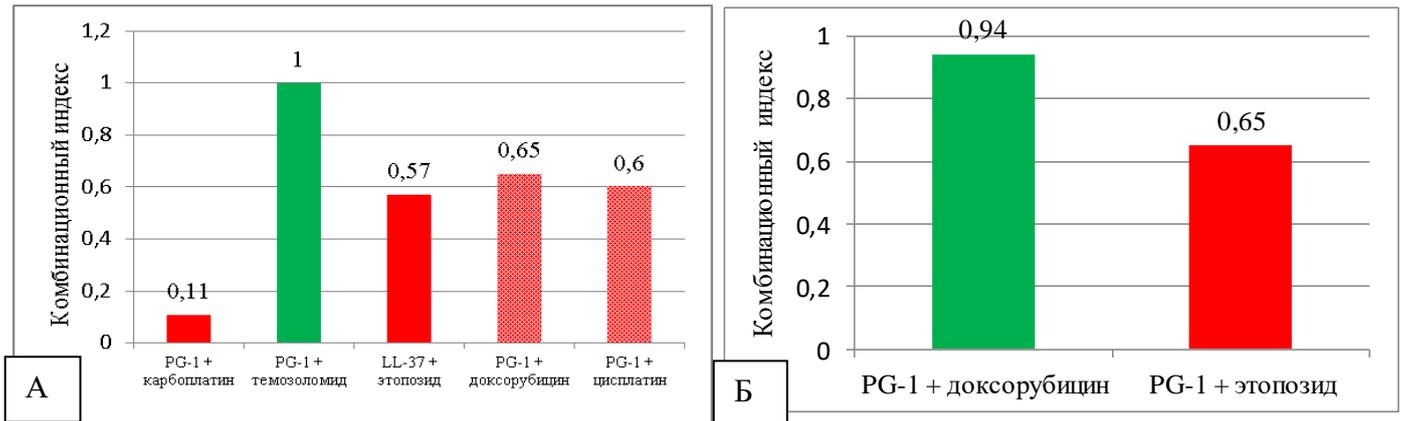


Рис. 1. Эффекты синергизма (красный цвет) и аддитивизма (зеленый цвет) комбинаций пептидов с химиопрепаратами на клетках глиомы С6 (А) и U251 (Б)

Оценивали цитотоксическую эффективность комбинаций NGF с химиопрепаратами на клетках ПА, АА ГБ и МБ, для чего рассчитывали средний ИЦ комбинаций, который сравнивали с ИЦ NGF (рис. 2).

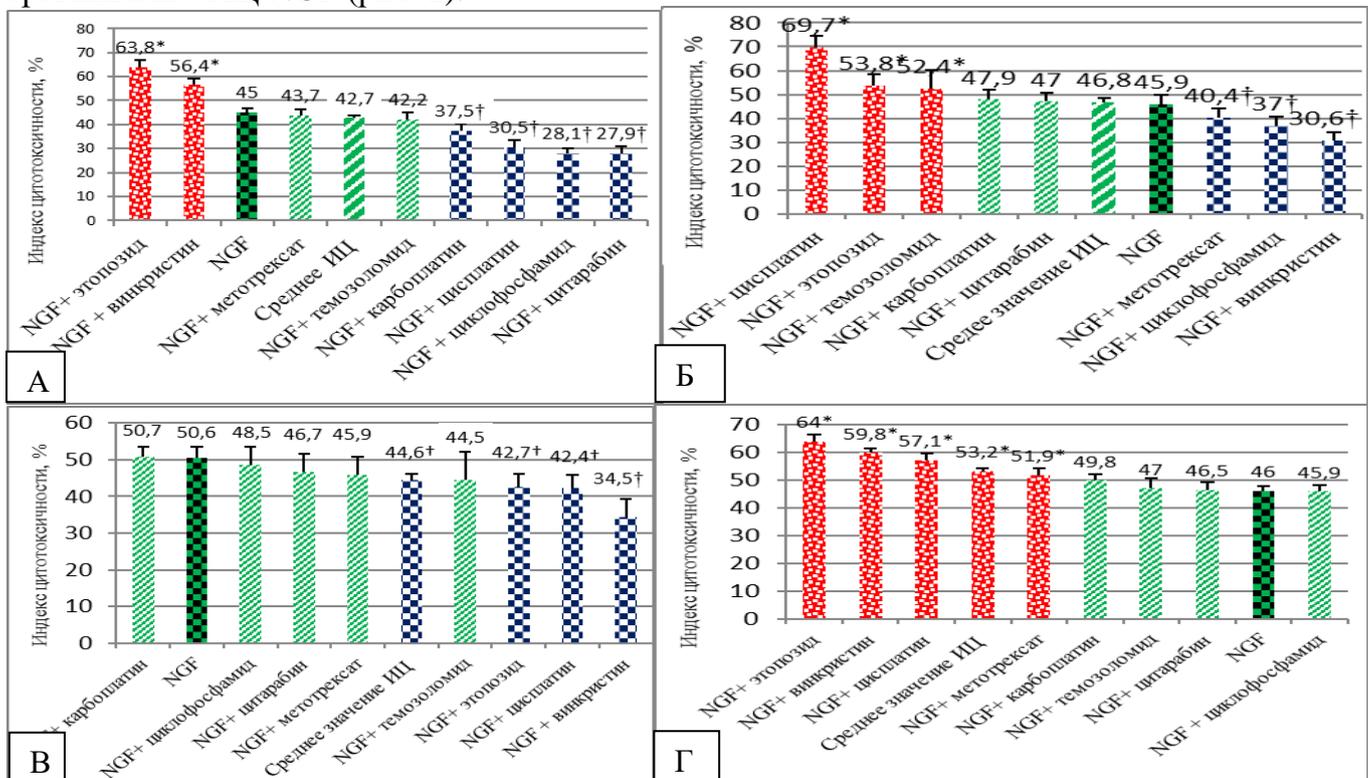


Рис. 2. Индекс цитотоксичности (%) комбинаций NGF с химиопрепаратами при односуточном действии *in vitro* на клетки ПА (А), АА (Б), ГБ (В) и МБ (Г).

Символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от NGF

Установлено, что ИЦ комбинаций NGF с химиопрепаратами статистически значимо не отличается от ИЦ NGF при действии на клетки ПА ($p=0,73$) и АА ($p=0,1$); статистически значимо ($p=0,005$) был ниже ИЦ NGF при действии на клетки ГБ и статистически значимо ($p=0,02$) был выше ИЦ NGF при действии на клетки МБ.

Определение действия фактора роста нервов и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга человека. Чтобы оценить действие NGF на клетки нейроглиальной ткани его действие сравнивали с эффектами химиопрепаратов. Для этого рассчитывали средний ИЦ химиопрепаратов ($41,1 \pm 0,2\%$, рис. 3А).

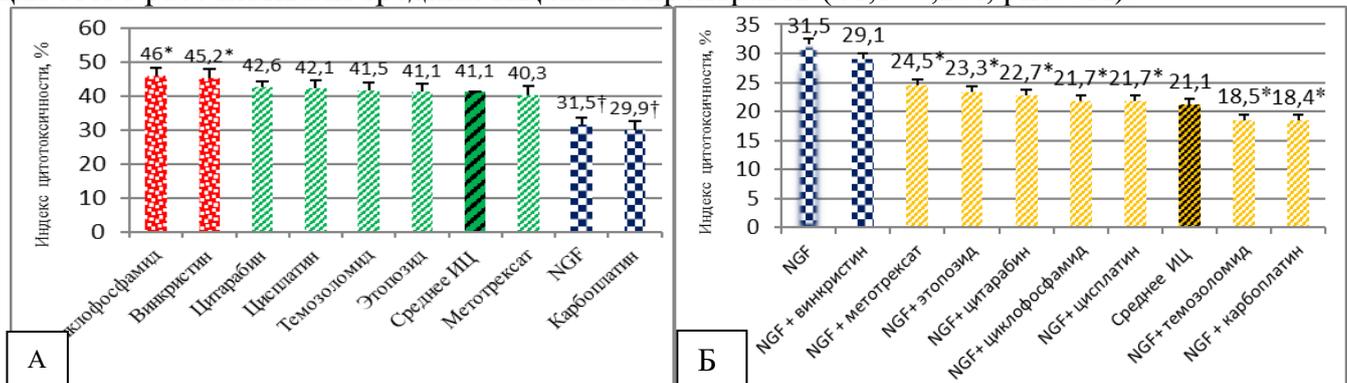


Рис. 3. Индекс цитотоксичности (%) химиопрепаратов и NGF при обособленном (А) и комбинированном (Б) действии *in vitro* на клетки нейроглиальной ткани головного мозга. Символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от среднего значения ИЦ химиопрепаратов (3А) или NGF (3Б).

Данные рис. 3 показывают, что ИЦ NGF был достоверно ($p = 8,7 \times 10^{-18}$) ниже ИЦ химиопрепаратов (за исключением ИЦ карбоплатина), что свидетельствует о менее выраженном по сравнению с химиопрепаратами действии NGF на клетки нейроглиальной ткани. Действие комбинаций NGF с химиопрепаратами сравнивали с NGF (рис. 3Б), для чего рассчитывали средний ИЦ комбинаций NGF с химиопрепаратами. На основании данных на рис. 3Б можно заключить, что 7 из 8 комбинаций (кроме NGF + винкристин) обладают еще более выраженным действием ($p < 0,05$) по сравнению с NGF, снижающим цитотоксический эффект химиопрепаратов на клетки нейроглиальной ткани.

Изучение типов гибели клеток интракраниальных опухолей при действии фактора роста нервов, протегрин-1 и их комбинаций с химиопрепаратами. Поскольку комбинация PG-1 с этопозидом оказывает синергетический эффект (рис. 1Б), было изучено ее действие в отношении типов гибели клеток глиомы U251с помощью окрашивания их ДНК красителями PI и YO-PRO-1 на проточном цитометре (рис. 4).

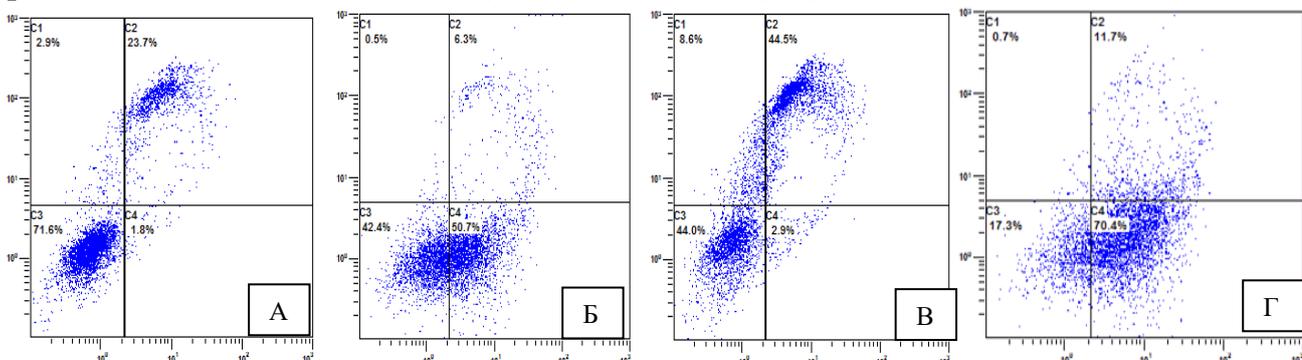


Рис. 4. Проточно-цитометрический анализ типов гибели клеток глиомы U251 человека с помощью красителей PI и YO-PRO-1 при односуточном *in vitro* действии этопозида (Б), PG-1 (В) и их комбинации (Г) в сравнении с контролем (А).

В квадратах С3 – живые клетки, С1 и С2 – поздний апоптоз или некроз, С4 – ранний апоптоз

Данные на рис. 4 показывают, что после 24 ч действия этопозидом 50,7±5,2% клеток глиомы U251 гибнут по типу апоптоза ($p<0,0001$) и 6,3±2,0% клеток гибнут по типу некроза. При 24 ч действии PG-1 53,1±2,8% клеток глиомы U251 гибнут по пути некроза ($p<0,0001$). При действии комбинации PG-1 с этопозидом 70,4±11,4% клеток глиомы U251 гибнут по типу апоптоза ($p<0,0001$) и 12,4±4,7% – по типу некроза ($p<0,0054$). Таким образом, комбинация PG-1 с этопозидом оказывает синергетический эффект на гибель клеток глиомы U251 за счет повышения ($p<0,0001$) доли клеток, погибших по пути апоптоза и некроза по сравнению с действием этопозидом и PG-1 соответственно. С целью верификации гибели клеток глиомы U251 по типу апоптоза при действии этопозидом, PG-1 и их комбинации была определена спектрофотометрически активность каспазы-3 (рис. 5).

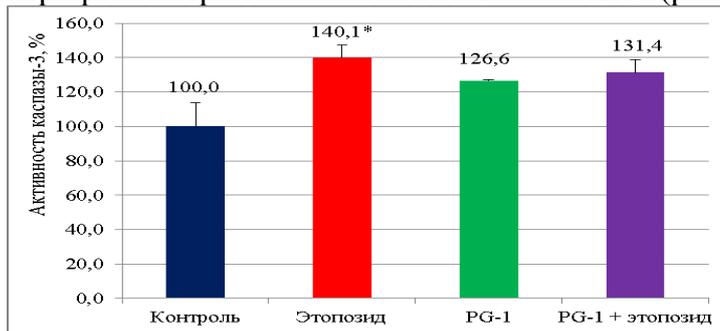


Рис. 5. Активность каспазы-3 в лизатах клеток глиомы U251 при односуточном *in vitro* действии этопозидом, PG-1 и их комбинации в сравнении с контролем символом * обозначены статистически значимые ($p<0,05$) отличия от контроля

Результаты на рис. 5 показывают, что при односуточном действии этопозидом наблюдается стимулирование активности каспазы-3 на 40% ($p=0,036$) по сравнению с необработанными клетками глиомы U251 в контроле. При действии PG-1 и комбинации PG-1 с этопозидом статистически значимого изменения активности каспазы-3 в лизатах клеток не наблюдалось.

В ходе электронно-микроскопического анализа клеток ПА и МБ установлены типы их гибели при обособленном и комбинированном действии цисплатина, темозоломида и NGF (табл. 5).

Таблица 5. Интенсивность спонтанного и индуцированного типов гибели клеток ПА и МБ при действии химиопрепаратов, NGF и его комбинаций с химиопрепаратами

Процент погибших клеток (абсолютный индекс)						
пилоцитарная астроцитома						
Тип гибели	контроль	цисплатин	NGF + цисплатин	темозоломид	NGF + темозоломид	NGF
Апоптоз	6,9 ± 0,5#	32,0 ± 1,9#^	4,7 ± 0,9†° #^	–	–	19,0 ± 2,6#
Некроз	39,1 ± 2,6*	60,0 ± 1,1*^	85,8 ± 1,4†° * ^\	80,0 ± 6,4*^	75,0 ± 4,8° *^	57,1 ± 3,3*^
Смешанный тип	–	8,0 ± 0,8*#	9,5 ± 1,3 #	20,0 ± 6,4*#	25,0 ± 4,8° #	14,5 ± 1,7#
медуллобластома						
Апоптоз	9,9 ± 1,9	95,2 ± 1,5#	37,5 ± 6,3†° ^	–	–	9,2 ± 1,4#^
Некроз	7,6 ± 1,3	4,8 ± 0,9*	50,0 ± 8,0†*^	93,7 ± 2,0*^	53,4 ± 3,8†° *	69,3 ± 2,8*^
Смешанный тип	7,6 ± 1,2	–	12,5 ± 3,5*#	6,3 ± 0,8*#	46,6 ± 4,5†° *	21,5 ± 2,2*#

Знаками † и ° обозначены отличия ($p<0,05$) процента погибших клеток при действии комбинации химиопрепарата с NGF по сравнению с обособленным применением реагентов. Статистически значимые отличия численности клеток обозначены символами: * – от погибших по типу апоптоза, # – некроза, ^ – по смешанному типу, знаком

Данные табл. 5 показывают, что при действии комбинации NGF с цисплатином на клетки ПА и МБ увеличивается ($p<0,05$) их гибель по типу некроза, а при действии комбинации NGF с темозоломидом усиливается ($p<0,05$) гибель опухолевых клеток по смешанному типу по сравнению с химиопрепаратами.

Потенциальные маркеры чувствительности клеток пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека к фактору роста нервов и химиопрепаратам. Определены корреляции между уровнем секреции IL-6 и степенью злокачественности, чувствительностью клеток ПА, АА, эпендимомы, ГБ и МБ при действии химиопрепаратов и NGF. Установлено, что уровень IL-6 коррелирует со степенью злокачественности опухолей (табл. 6).

Таблица 6. Коэффициенты корреляции между степенью злокачественности клеток интракраниальных опухолей и секрецией IL-6 при действии *in vitro* химиопрепаратов и NGF

Реагент	Уровень секреции IL-6 (нг/л), степень злокачественности опухоли, Gr		Коэфф- циент коррел- ции, r	Уровень значимост и r, p
	низкозлокачественные I-II, n=16	высокозлокачественные III-IV, n=21		
Контроль	115,3±8,7	1212,3±44,6*	0,70	<i>p</i> < 0,001
Винкристин	66,9±13,5	805,1±84,6*	0,61	<i>p</i> < 0,001
Карбоплатин	84,6±8,1	801,7±64,7*	0,58	<i>p</i> < 0,001
Метотрексат	81,5±7,3	844,1±53,2*	0,57	<i>p</i> < 0,001
Темозоломид	–	784,2±78,2	–	–
Циклофосфамид	81,5±12,6	747,5±51,9*	0,64	<i>p</i> < 0,001
Цисплатин	111,1±16,0	997,4±90,3*	0,65	<i>p</i> < 0,001
Цитарабин	120,7±13,6	737,9±72,8*	0,53	<i>p</i> < 0,001
Этопозид	103,2±12,0	864,7±57,3*	0,61	<i>p</i> < 0,001
NGF	99,6±10,4	728,8±64,6*	0,64	<i>p</i> < 0,001

Жирным шрифтом обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) корреляционной зависимости, при степенях свободы $df=109$, n – количество пациентов, символ * обозначает статистически значимые ($p < 0,05$) отличия между уровнем секреции IL-6 при действии реагентов в группах низко- (ПА и эпендимома) и высокозлокачественных опухолей (АА, ГБ и МБ)

Данные табл. 6 документируют наличие статистически значимых ($p < 0,001$) положительных корреляций между степенью злокачественности опухолей (ПА, АА, ГБ, МБ и эпендимома) и уровнем IL-6. Определены отрицательная корреляция ($r = -0,60$) между ИЦ химиопрепаратов и уровнем IL-6, секретлируемого клетками эпендимомы. Такого же знака корреляции обнаружены между ИЦ NGF и IL-6, секретлируемого клетками эпендимомы ($r = -0,95$, $p < 0,0001$) и ГБ ($-0,49$, $p < 0,05$). Полученные результаты позволяют в перспективе использовать оценку IL-6 в качестве прогностического маркера злокачественности и химиорезистентности опухолей мозга.

Изучена экспрессия TrkA, p75 рецепторов и определено их соотношение TrkA/p75 на клетках АА, ГБ и МБ при действии NGF и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом. Для чего оценивали экспрессию рецепторов в пересчете на одну клетку (рис. 6).

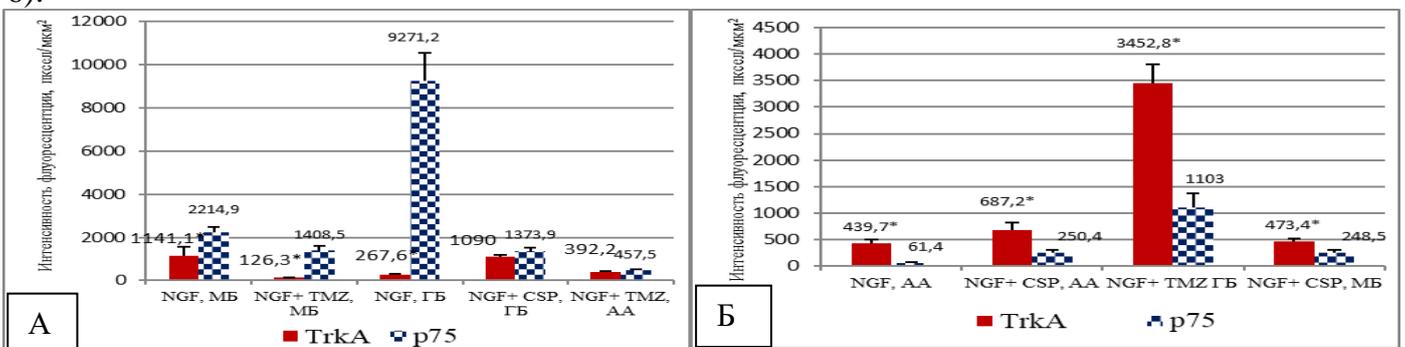


Рис. 6. Серии экспериментов, где в опухолевых клетках доминировала экспрессия p75 рецептора (группа «p75») (А) и TrkA рецептора (группа «TrkA») (Б).

Символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия экспрессии TrkA от p75 рецептора

Анализ полученных результатов позволил распределить серии экспериментов по двум группам, в каждой из которых статистически значимо ($p < 0,05$) преобладала экспрессия TrkA или p75 рецепторов. К группе «p75» (рис. 6А) были отнесены 5 серий опытов, в каждой из которых на клетках одного типа опухоли действовали одним из реагентов: NGF и комбинация NGF с темозоломидом на МБ; NGF, комбинация NGF с цисплатином на ГБ; NGF с темозоломидом на АА. К группе «TrkA» (рис. 6Б) были отнесены четыре серии: при действии комбинации NGF с цисплатином в отношении клеток МБ, комбинации NGF с темозоломидом на ГБ; NGF, комбинации NGF с цисплатином на клетки АА. 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. Установлена зависимость между ИЦ NGF, комбинаций с цисплатином или темозоломидом и экспрессией TrkA, p75 рецепторов, их соотношением TrkA/p75 на клетках опухолей (табл. 7).

Таблица 7. Коэффициенты корреляций экспрессии TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 с ИЦ NGF и его комбинаций с химиопрепаратами при действии на клетки опухолей

Серия эксперимента	df	Коэффициент корреляции с индексом цитотоксичности, r. Уровень значимости, p								
		анапластическая астроцитома			глиобластома			медуллобластома		
		TrkA	p75	TrkA/p75	TrkA	p75	TrkA/p75	TrkA	p75	TrkA/p75
NGF	188	0,13	-0,32	0,43*	0,27	-0,71*	0,44*	0,12	-0,28	0,26
NGF + цисплатин	188	-0,19	0,68*	-0,20	-0,65*	-0,06	-0,47*	-0,04	-0,3	0,25
NGF + темозоломид	188	0,42*	-0,51*	0,46*	0,50*	-0,53*	0,63*	0,27	0,34	-0,01

Жирным шрифтом и *обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) коэффициенты корреляций между ИЦ и экспрессией TrkA и p75 рецепторов, их соотношением, df – число степеней свободы для каждой серии экспериментов

Статистически значимые корреляции различного знака между экспрессией TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 и ИЦ реагентов выявлены для клеток АА и ГБ. Это свидетельствует, что в результате гибели опухолевых клеток наблюдается активация сигнальных каскадов, запускаемых через рецепторы. TrkA рецепторы активируются в клетках АА и ГБ при действии NGF и комбинации NGF с темозоломидом. При действии комбинации NGF с цисплатином наблюдается гибель клеток АА и ГБ, опосредованная взаимодействием с p75 рецепторами. Изучено действие NGF на численность копий MYCC, MYCN-онкогенов в клетках МБ (рис. 7).

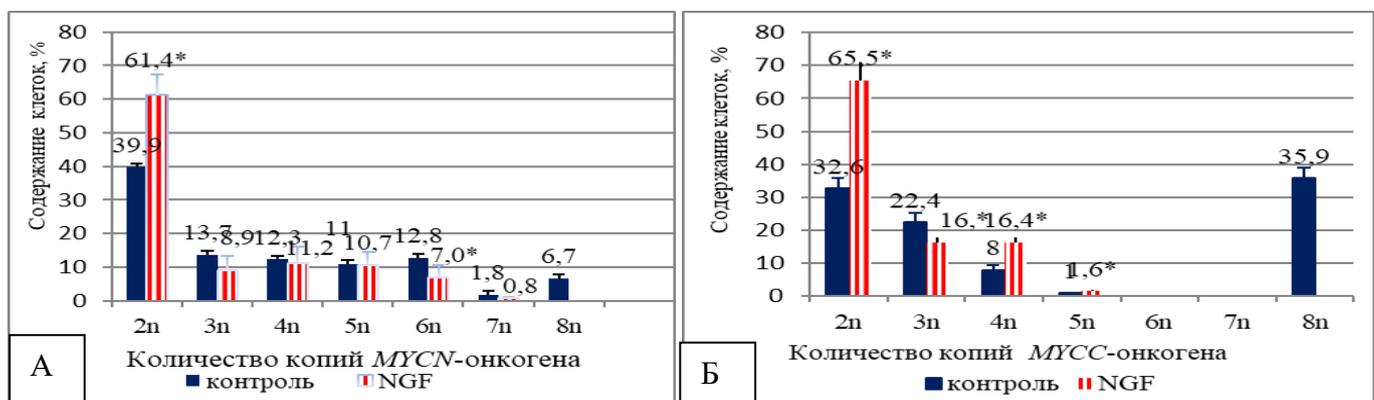


Рис. 7. Содержание клеток МБ с различным числом копий MYCN-онкогена (А) и MYCC-онкогена (Б) при односуточном *in vitro* действии NGF.

Символом * обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от контроля

Данные рис. 7 показывают, что действие NGF снижает ($p < 0,05$) долю клеток МБ, содержащих 6n, 8n копий *MYCN*-онкогена и 3n, 8n копий *MYCC*-онкогена, но увеличивает ($p < 0,05$) содержание клеток с диплоидным набором обоих онкогенов.

Результаты исследования позволили поставить вопрос: как чувствительность клеток МБ зависит от количества копий онкогенов? Для этого рассчитывали среднее количество копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов в клетках МБ от каждого пациента как отношение суммы произведений численности клеток, содержащих конкретный набор онкогена на число копий онкогена к 100% клеток в каждой серии. Определяли коэффициенты корреляций между средним количеством копий онкогенов и ИЦ NGF (табл. 8).

Таблица 8. Коэффициент корреляции (r) между средним количеством копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов в клетках МБ и ИЦ NGF, гибелью клеток в контроле

Серия опыта	df	Онкоген				Индекс цитотоксичности (гибель), %
		<i>MYCN</i>		<i>MYCC</i>		
		среднее количество копий	корреляция, r	среднее количество копий	корреляция, r	
Контроль	7	2,7±0,3	0,27	2,9±0,4	0,03	22,1±2,0
NGF	7	2,5±0,2	-0,33	2,3±0,07*	-0,65 $p < 0,0001$	46,2±3,8*

Жирным шрифтом обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) значения коэффициента корреляции r при степенях свободы $df = n - 2$. Символом * обозначены статистически значимые отличия от контроля при $p < 0,05$

Результаты в табл. 8, свидетельствуют о наличии статистически значимой ($p < 0,0001$) отрицательной корреляции ($r = -0,65$) между средним числом копий *MYCC*-онкогена и ИЦ NGF. Этот факт доказывает участие *MYCC*-онкогена в снижении чувствительности клеток МБ к NGF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что NGF, LL-37 и PG-1 обладают выраженной противоопухолевой активностью, даже превосходящей по показателям эффективность действия химиопрепаратов на клетки глиомы С6 крысы и глиомы U251 человека *in vitro*. Кроме того, показатели цитотоксической активности NGF в отношении клеток ПА и АА сопоставимы с показателями, характеризующими противоопухолевое действие химиопрепаратов, или превышают их в случае клеток ГБ и МБ.

Для комбинаций PG-1 с карбоплатином, доксорубицином, цисплатином и LL-37 с этопозидом установлен синергизм их цитотоксической активности в отношении клеток глиомы крысы С6. Тогда как в отношении клеток глиомы U251 человека синергизм цитотоксического действия проявляет только комбинация PG-1 с этопозидом. При сочетанном действии NGF с химиопрепаратами также наблюдается повышение цитотоксической активности в отношении клеток ПА и АА, ГБ и МБ пациентов. Вместе с тем клетки опухолей пациентов обладают персонифицированной чувствительностью к химиопрепаратам, что позволяет сравнивать по значению ИЦ действие и выбрать наиболее эффективный химиопрепарат для конкретного пациента.

Совместное использование NGF с химиопрепаратами оказывает *in vitro* действие, снижающее цитотоксический эффект химиопрепаратов в отношении клеток нормальной нейроглиальной ткани мозга. На основании этих данных можно заключить, что комбинированное применение NGF с химиопрепаратами позволяет снизить дозу химиопрепарата, при сохранении цитотоксического эффекта в отношении клеток опухолей при менее токсичном действии на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга.

Данные о цитотоксической активности LL-37 и PG-1, NGF и их комбинаций с химиопрепаратами на клетки глиом С6, U251 и NGF и его комбинаций с химиопрепаратами на клетки интракраниальных опухолей человека позволяют рассматривать NGF, LL-37 и PG-1 и их комбинации с химиопрепаратами в качестве потенциальных препаратов для дальнейших доклинических и клинических испытаний. Проведенное исследование эффектов NGF (уровень секреции IL-6, типы гибели клеток, число копий *MYCC*, *MYCN*-онкогенов), комбинаций NGF с химиопрепаратами (типы гибели клеток, уровень экспрессии TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75) на клетках ПА, АА, ГБ, МБ и пептидов PG-1, LL-37 (исследование характера клеточной гибели и др.) на клетки глиомы U251 предоставляет важную информацию для разработки таких противоопухолевых препаратов.

Проведение стратификации у 18 пациентов с медуллобластомой по группам риска, определяющим интенсивность и продолжительность химиотерапии на основе оценки амплификации *MYCC*, *MYCN* онкогенов FISH анализом, внедрено в клиническую практику РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Обнаружение амплификации в 22,2% пациентов с МБ и данные по общей выживаемости у пациентов с МБ (выживаемость у пациентов с наличием амплификации составляет – 0%, а у пациентов без амплификации – 68%), свидетельствуют о высокой корреляции между данными показателями и эффективностью терапии. Это позволяет рекомендовать оценку амплификации *MYCC*-, *MYCN*-онкогенов у пациентов с МБ в качестве молекулярно-генетического критерия (маркера) прогнозирования исхода терапии.

ВЫВОДЫ

1. Фактор роста нервов (NGF), кателицидин LL-37 и протегрин PG-1 проявляют *in vitro* цитотоксическую активность, превосходящую по показателям активность химиопрепаратов в отношении клеток глиом С6 и U251. Кроме того, NGF демонстрирует *in vitro* цитотоксическую активность, сопоставимую с действием химиопрепаратов, в отношении клеток пилоцитарной, анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы человека. Полученные данные позволяют рассматривать NGF и пептиды в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов для терапии опухолей головного мозга.

2. Для комбинаций PG-1 с карбоплатином, доксорубицином, цисплатином, этопозидом, а также LL-37 с этопозидом, выявлен синергизм цитотоксического действия на клетки глиом С6 и U251 *in vitro*. Цитотоксическая активность NGF в комбинации с химиопрепаратами была существенно выше активности индивидуального препарата NGF в отношении клеток медуллобластомы, в то время как показатели активности комбинаций NGF с химиопрепаратами в отношении клеток пилоцитарной и анапластической астроцитомы были сопоставимы с показателями обособленного действия NGF, а для клеток глиобластомы даже несколько более низкими. Полученные результаты дают основание рассматривать комбинации NGF, PG-1, LL-37 с химиопрепаратами в качестве потенциальной схемы для комбинированной терапии определенных типов опухолей мозга у пациентов.

3. NGF и семь из восьми его комбинаций с химиопрепаратами оказывают *in vitro* эффекты, снижающее токсическое действие химиопрепаратов на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга. Вместе с тем, по сравнению с химиопрепаратами, NGF обладает более слабым цитотоксическим *in vitro* действием, которое еще более снижается при их комбинированном применении на клетки нормальной нейроглиальной ткани мозга.

4. В результате анализа механизма синергического действия PG-1 с этопозидом на клетки глиомы U251 показано, что при совместном действии этих соединений *in vitro* наблюдается увеличение гибели клеток по пути апоптоза по сравнению с действием этопозидом и PG-1. При действии этопозидом отмечается повышение активности каспазы-3, что

подтверждает апоптотическую гибель клеток U251. При комбинированном действии NGF с химиопрепаратами отмечается гибель клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы по смешанному типу и некрозу, чем по пути апоптоза при обособленном действии NGF и химиопрепаратов.

5. Обнаружены корреляции между степенью злокачественности пилоцитарной астроцитомы, анапластической астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы, медуллобластомы, их чувствительностью к химиопрепаратам, NGF и уровнем секреции интерлейкина-6, что позволяет в перспективе использовать уровень интерлейкина-6 в качестве диагностического маркера злокачественности и химиорезистентности клеток опухолей мозга.

6. Цитотоксическая активность NGF и его комбинаций с цисплатином или темозоломидом на клетки анапластической астроцитомы и глиобластомы коррелирует с экспрессией на них TrkA, p75 рецепторов, их соотношения TrkA/p75, показывая, что TrkA/p75 может служить маркером чувствительности клеток анапластической астроцитомы и глиобластомы к NGF и его комбинациям с химиопрепаратами.

7. При *in vitro* применении NGF наблюдается увеличение содержания опухолевых клеток с диплоидным числом копий *MYCN*, *MYCC*-онкогенов и уменьшение доли клеток медуллобластомы с повышенным числом копий обоих онкогенов, обладающих пониженной чувствительностью к NGF, что позволяет рассматривать численность копий *MYCC*-онкогена в качестве маркера резистентности медуллобластомы к NGF и химиотерапии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты о прямом цитотоксическом действии NGF, LL-37 и PG-1 и их комбинаций с химиопрепаратами с синергетическим эффектом на клетки глиом C6, U251, а также NGF и его некоторых комбинаций с химиопрепаратами в отношении клеток ПА, АА, ГБ и МБ пациентов позволяют рассматривать NGF, LL-37 и PG-1 и их комбинации с химиопрепаратами, как прототипы лекарственных препаратов и объекты для доклинических и клинических испытаний.

2. Установленные зависимости между уровнем секреции IL-6 клетками ПА, эпендимомы, АА, ГБ, МБ и степенью злокачественности опухолей их химиорезистентностью при действии химиопрепаратов, NGF, а также экспрессией TrkA, p75 рецепторов, TrkA/p75 на клетках АА, ГБ и чувствительностью к NGF, комбинациям NGF с цисплатином или темозоломидом, отрицательная корреляция между численностью копий *MYCC*-онкогена в клетках МБ и индексом цитотоксичности NGF свидетельствуют о перспективности использования уровня секреции IL-6, численности копий *MYCC*-онкогена и экспрессии TrkA, p75 рецепторов, их соотношения TrkA/p75 в качестве диагностических и прогностических маркеров и мишеней для таргетной терапии опухолей мозга.

3. Разработанный и использованный в работе вариант метода «индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения медуллобластомы, атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли, нейробластомы, астроцитомы, эпендимомы у ребенка», основанный на определении гибели клеток в камере Горяева при окрашивании трипановым синим ИЦ, позволяет установить и выбрать химиопрепарат или их комбинацию с наибольшим цитотоксическим действием на клетки опухоли у конкретного пациента, а также внести в протоколы химиотерапии соответствующие коррективы.

Полученные сведения могут использоваться в учебном процессе на биологических и медицинских факультетах ВУЗов, а также в клинической практике онкологических стационаров специализированных медицинских учреждений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава в монографии:

1. Improving the efficiency of chemotherapeutic drugs by the action on neuroepithelial tumors // Glioma – exploring its biology and practical relevance / V. A. Kulchitsky, M. V. Talabaev, **A. N. Chernov**, D. G. Grigoriev, Y. E. Demidchik, D. G. Shcharbin, N. M. Chekan, V. V. Kazbanov, T. A. Gurinovich, A. I. Gordienko, E. K. Sergeeva, V. I. Potkin, V. N. Kalunov ; Intech ; ed.: A. Ghosh. – Rijeka (Croatia), 2011. – Chap. 21. – P. 465–486.

Статьи в журналах:

2. Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs and heterocyclic compounds at application on cells of primary culture of neuroepithelium tumors / V. A. Kulchitsky, V. I. Potkin, Y. S. Zubenko, **A. N. Chernov**, M. V. Talabaev, Y. E. Demidchik, S. K. Petkevich, V. V. Kazbanov, T. A. Gurinovich, M. O. Roeva, D. G. Grigoriev, A. V. Kletskov, V. N. Kalunov // J. of Med. Chemistry. – 2012. – Vol. 8, № 1. – P. 22–32.

3. Культуры клеток злокачественных новообразований человека в разработке новых противоопухолевых препаратов / **А. Н. Чернов**, Е. П. Баранцевич, Э. С. Галимова, М. М. Галагудза // Патогенез. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 13-23.

4. Related expression of TRKA and P75 receptors and the changing copy number of MYC-oncogenes determine the sensitivity of brain tumor cells to the treatment of the nerve growth factor in combination with cisplatin and temozolomide / **A. N. Chernov**, D. A. Alaverdian, O. S. Glotov, M. V. Talabaev, S. P. Urazov, S. G. Shcherbak, O. V. Shamova // Drug Metabolism and Personalized Therapy. – 2020. – Vol. 35, № doi: 10.1515/dmdi-2020-0109.

5. The phenomenon of multidrug resistance in glioblastomas / **Chernov A. N.**, Alaverdian D A., Galimova E. S, Renieri A, Frullanti E, Shamova O.V. // Hematology/Oncology and Stem cell Therapy. 2021; <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2021.05.006>

6. Молекулярные механизмы множественной лекарственной устойчивости глиобластом человека / **А.Н. Чернов**, И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, Э. С. Галимова, Д. А. Алавердиан, О. В. Шамова // Вопросы онкологии. – 2021. – Т. 67, № 1. – С. 20-28.

7. **Чернов, А. Н.** Разработка варианта метода оценки индивидуальной чувствительности клеток нейроэпителиальных опухолей к химиопрепаратам в *in vitro* / **А. Н. Чернов**, В. Н. Калюнов, Н. Е. Конопля // Злокачественные опухоли. – 2015. – Т. 3. – С. 40-52.

8. **Чернов, А. Н.** Исследование чувствительности клеток интракраниальных неоплазий к химиопрепаратам / **А. Н. Чернов**, Н. Н. Яцков, В. В. Скакун // Росс. журн. детской гематологии и онкологии. – 2015. – Т. 4. – С. 51-57.

9. **Чернов, А. Н.** Цитотоксическое избирательное действие комбинаций фактора роста нервов с химиопрепаратами на культуры клеток нейроэпителиальных опухолей и нейроглиальной ткани человека / **А. Н. Чернов** // Вестник Воронежского гос. университета. Серия Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 4. – С. 157-164.

10. **Чернов, А. Н.** Соотношение рецепторов TRKA и P75 на клетках нейроэпителиальных опухолей – новая мишень воздействия комбинаций фактора роста нервов с цисплатином или темозоломидом / **А. Н. Чернов** // Опухоли головы и шеи. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 58-66.

11. **Чернов, А. Н.** Методы подбора *in vitro* химиопрепаратов для индивидуальной химиотерапии злокачественных новообразований пациентов / **А. Н. Чернов**, Е. П. Баранцевич, В. Н. Калюнов, М. М. Галагудза // Трансляционная медицина. – 2018. – Т. 5, № 1. – С. 45-65.

12. Опухолевые модели мышей в тестировании противоопухолевых препаратов / Т. Л. Нехаева, **А. Н. Чернов**, Я.Г. Торопова, М. М. Галагудза, И. А. Балдуева // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66, № 4. – С. 353-363.

13. **Чернов, А. Н.** Ультраструктурные корреляты механизмов обособленного и комбинированного действия цисплатина, темозоломида, фактора роста нервов на клетки астроцитомы и медуллобластомы человека/ **А. Н. Чернов** // Трансляционная медицина. – 2019. – № 1. – С. 28-42.

Статьи в сборниках конференций:

14. **Чернов, А. Н.** Интенсивность секреции интерлейкина-6 клетками первичных культур нейроэпителиальных опухолей – маркер их чувствительности к химиопрепаратам и фактору роста нервов/ **А. Н. Чернов** // «Клеточные культуры». Инф. бюллетень. СПб, 2013. – Вып. 29. – С. 54-65.

15. **Чернов, А. Н.** Определение чувствительности клеток нормальной нейроглиальной ткани человека к химиопрепаратам, фактору роста нервов и их комбинациям / **А. Н. Чернов**, В. Г. Бурак // Регенеративная медицина – медицина будущего: материалы Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых. Томск, 24-25 сент. 2014 г. Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФГБУ «Сибирский федеральный науч.-клинический центр ФМБА России, Томск, 2014. – С. 56-61.

Тезисы докладов:

16. Морфо-функциональные показатели культуры клеток глиомы С6 в контроле и под действием фактора роста нервов / **А. Н. Чернов**, В. Н. Калюнов, М. О. Роева, В. А. Кульчицкий // Методы культивирования клеток : школа-конф. для молодых ученых : тез. докл., Санкт-Петербург, 13–17 окт. 2008 г. / Ин-т цитологии Рос. акад. наук. – [Опубл. в журн.] Цитология. – 2008. – Т. 50, № 9. – С. 829–830.

17. Морфо-функциональная характеристика клеток крысиной глиомы С6 при действии химиопрепаратов / **А. Н. Чернов**, М. В. Талабаев, Д. Г. Григорьев, В. А. Кульчицкий // Механизмы функционирования висцеральных систем : VII Всерос. конф. с междунар. участ., посвящ. 160-летию со дня рождения И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 29 сент.–2 окт. 2009 г. : тез. докл. / Ин-т физиологии им. И. П. Павлова РАН ; ред.: В. А. Цветкова. – СПб., 2009. – С. 439–440.

18. Оценка химиочувствительности клеток медуллобластомы с целью выбора оптимальной тактики лечения / **А. Н. Чернов**, М. В. Талабаев, Д. Г. Григорьев, Е. Д. Черстой, В. А. Кульчицкий // матеріали XVIII зїзду Українського фізіологічного товариства з Міжнар. участ., Одеса, 20–22 трав. 2010 р. : тез. докл. / Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Нац. акад. наук України. – [Опубл. в журн.] Фізіол. журн. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 291.

19. Изучение *in vitro* жизнеспособности клеток пилоцитарной астроцитомы и медуллобластомы человека при действии химиопрепаратов и фактора роста нервов / **А. Н. Чернов**, М. В. Талабаев, Д. Г. Григорьев, В. Н. Калюнов, В. А. Кульчицкий // Генетическая и регенеративная медицина: проблемы и перспективы: материалы навуч.-практ. конф. с Міжнар. участ, Київ, Украина, 14–15 жовт. 2010 р. : тез. докл. / Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України. – [Опубл. в журн.] Журн. акад. мед. наук України. – 2010. – Т. 16. – Дадатак. – С. 179–180.

20. **Чернов, А. Н.** Оценка *in vitro* жизнеспособности клеток пилоцитарной астроцитомы человека при действии химиопрепаратов и фактора роста нервов / **А. Н. Чернов** // Механизмы адаптации физиологических систем организма к факторам среды : материалы Всерос. конф. с междунар. участ., посвященную 85-летию со дня основания Ин-та

физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 21–22 дек. 2010 г. / Ин-т физиологии им. И. П. Павлова РАН ; ред.: В. А. Цветкова. – СПб., 2010. – С. 115–116.

21. Study of *in vitro* sensitivity of tumor cells of the central nervous system to chemotherapeutic drugs and nerve growth factor / **A. N. Chernov**, V. N. Kalunov, M. V. Talabaev, D. G. Grigoriev, Y. E. Demidchik, E. D. Cherstvoy, V. A. Kulchitsky // Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research : with intern. symp. on anti-cancer agents, cardiotoxicity and neurotoxicity : abstr. the Sci. conf. with Intern. participation, Kragujevac (Serbia), 15–18 March, 2011 / University of Kragujevac. – Kragujevac (Serbia), 2011. – P. 26.

22. Исследование *in vitro* чувствительности неопластических клеток нервной системы к химиопрепаратам и фактору роста нервов / **А. Н. Чернов**, М. В. Талабаев, А. П. Корень, Д. Г. Григорьев, В. Н. Калюнов, В. А. Кульчицкий // X юбил. Всерос. науч.-практ. конф. «Поленовские чтения», Санкт.-Петербург, 19–22 апр. 2011 г. : тез. докл. / Рос. нейрохирург. журн. им. проф. А.Л. Поленова. – [Опубл. в журн.] Рос. нейрохирург. журн. им. проф. А.Л. Поленова. – 2011. – Т. III. – Спец. выпуск. – С. 384–385.

23. **Чернов А.Н.** Уровень интерлейкина-6 в культуральной среде при аппликации фактора роста нервов на клетки первичной культуры нейроэпителиальных опухолей. Клеточные технологии для регенеративной медицины // Школа-конф. для молодых ученых, Санкт.-Петербург, 17–21 окт. 2011 г. Цитология. – 2011. – Т. 53, № 9. – С. 752–753.

24. Электронно-микроскопические особенности изолированного и сочетанного действия химиопрепаратов и фактора роста нервов на клетки пилочитарной астроцитомы человека / А. Н. Чернов, А. А. Емельянова, В. Н. Калюнов, В. А. Кульчицкий // Ежегодные Давиденковские чтения : материалы Всерос. науч.-практ. конф. посвящ. 150-летию со дня рождения проф. Л. В. Блуменау, С.-Петерб., 18–19 сент. 2012 г. / М-во здравоохранения и социального развития Российской Федерации ; ред.: И. В. Кольцова. – СПб. : «Человек и его здоровье», 2012. – С. 277–278.

Патенты:

25. Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения медуллобластомы у ребенка : пат. ВУ 15518 / **А. Н. Чернов**, М.В. Талабаев, Д.Г. Григорьев, В.А. Кульчицкий. – Опубл. 28.02.2012

26. Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения астроцитомы у ребенка : пат. ВУ 15520 / **А. Н. Чернов**, М.В. Талабаев, Д.Г. Григорьев, В. Н. Калюнов, В. А. Кульчицкий. – Опубл. 28.02.2012.

27. Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения глиальной опухоли центральной нервной системы : пат. ВУ 15633 / **А. Н. Чернов**, В.А. Кульчицкий, М. В. Талабаев. – Опубл. 30.04.2012.

28. Способ индивидуального подбора химиопрепарата или их комбинации для оптимизации лечения эпендимомы у ребенка : пат. ВУ 16006 / **А.Н. Чернов**, М.В. Талабаев, Д.Г. Григорьев, В.Н. Калюнов, В.А. Кульчицкий. – Опубл. 30.06.2012.

29. Способ индивидуального подбора химиопрепарата или комбинации химиопрепаратов для лечения атипичной тератоидной / рабдоидной опухоли человека : пат. ВУ 17256 / **А.Н. Чернов**, М. В. Талабаев, Д.Г. Григорьев, В.Н. Калюнов, В.А. Кульчицкий. – Опубл. 30.06.2013.

30. Способ определения чувствительности клеток нейробластомы человека к химиопрепарату или их комбинации химиопрепаратов : пат. ВУ 17752 / **А.Н. Чернов**, М.В. Талабаев, В.Н. Калюнов, Д.Г. Григорьев, В.А. Кульчицкий. – Опубл. 30.12.2013.

Список сокращений

AA	анапластическая астроцитома
ГБ	глиобластома
ИЦ	индекс цитотоксичности
МБ	медуллобластома
МТТ	метилтетразолиевый тест
ПА	пилоцитарная астроцитома
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭТС	эмбриональная телячья сыворотка
С6	глиома крысы С6
DMEM	среда Игла в модификации Дульбекко
IL-6	интерлейкин-6
i-FISH	интерфазная флуоресцентная in situ гибридизация
FITC	флуоресцилизотиоционат
Gr	степень злокачественности опухоли
LL-37	кателицидин LL-37 человека
MYCC	гомолог вирусного v-мус онкогена миелоцитоматоза
MYCN	аналог MYCV-онкогена вирусного миелоцитоматоза, производимый нейробластомой
NGF	фактор роста нервов
p75	низкоаффинный рецептор p75 NGF
PG-1	протегрин-1 свиньи
TrkA	тирозинкиназный рецептор А NGF
TrkA/p75	соотношение рецепторов
U251	глиома U251 человека