

Исследование роли компонентов антиоксидантных систем в формировании химиорезистентности клеток глиобластомы

Научный руководитель – Кордюкова Мария Юрьевна

Щукина Ольга Михайловна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия

E-mail: wikinaolya17@mail.ru

Введение. Глиобластома (ГБМ) – наиболее распространенная злокачественная опухоль головного мозга у взрослых, выживаемость пациентов составляет не более 5%. Одним из факторов резистентности ГБМ к терапии является популяция клеток опухоли, обладающая стволовыми свойствами – стволовые клетки глиобластомы (СКГ), которые служат драйверами рецидивов. По профилю экспрессии генов СКГ можно классифицировать на два подтипа: пронеуральный и мезенхимальный [1]. СКГ мезенхимального подтипа характеризуются наибольшей устойчивостью к химиотерапии. Известно также, что химиорезистентность ГБМ может обеспечиваться устойчивостью клеток опухоли к окислительному стрессу. Чтобы выяснить, какую роль этот фактор играет в поддержании химиорезистентности ГБМ, целью настоящей работы является исследование активности антиоксидантных систем СКГ с различной чувствительностью к терапии [2].

Материалы и методы. В работе использовали 6 первичных культур СКГ, полученных в нашей лаборатории из опухолевого материала пациентов с диагнозом ГБМ. Клетки культивировали на бессывороточной среде с добавлением факторов эпидермального фактора роста (EGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF), чтобы сохранить фенотип СКГ исходной опухоли [3]. Для валидации стволовых свойств полученных клеток их дифференцировали путем культивирования в среде, содержащей фетальную бычью сыворотку (ФБС), после чего анализировали изменение экспрессии фенотипа клеток при дифференцировке методами ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимии. Затем с помощью цитотоксического теста характеризовали устойчивость клеток к темозоломиду (ТМЗ) – основному химиопрепарату, применяемому для лечения ГБМ. Далее оценивали активность антиоксидантных систем СКГ, определяя величину экспрессии ключевых генов антиоксидантных ферментов – глутатионпероксидазы 1 (GPX1) и тиоредоксинредуктазы 1 (TXNRD1) методом ПЦР в реальном времени, оценивая активность этих ферментов методами ферментативной кинетики, а также измеряя общее содержание внутриклеточного глутатиона. На следующем этапе, чтобы изучить роль компонентов антиоксидантных систем в поддержании устойчивости СКГ к химиотерапии, проводили подавление экспрессии ключевых ферментов антиоксидантной защиты, GPX1 и TXNRD1, методом РНК-интерференции. Эффективность подавления экспрессии соответствующих генов валидировали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, комплементарных участкам генов GPX1 и TXNRD1. Для оценки редокс-статуса СКГ с различной устойчивостью к терапии оценивали соотношение глутатиона, для чего в клетках экспрессировали генетически кодируемый биосенсор GRX1-гоGFP2, чувствительный к глутатиону, что позволяет в режиме реального времени наблюдать динамику редокс-состояния глутатионовой системы в живых клетках, не оказывая значимого влияния на внутриклеточные процессы.

Результаты. Для анализа были использованы 6 первичных культур СКГ, 3 из которых имели характеристики пронеурального подтипа, а 3 – мезенхимального. Клетки всех 6

культур демонстрировали стволовые свойства: при культивировании на среде с добавлением ФБС, экспрессия стволовых маркеров СКГ (Sox2, Nestin) снижалась. Кроме того, под действием сыворотки клетки различных культур дифференцировались по-разному: в большинстве культур возрастала экспрессия маркеров зрелых астроцитов (GFAP, S100b), в то время как в некоторых увеличивалась экспрессия маркеров нейрональной дифференцировки (TUBB3). Все культуры пронеурального подтипа демонстрировали чувствительность к ТМЗ, в то время как две из трех культур мезенхимального подтипа были устойчивы к этому препарату. При этом культуры пронеурального подтипа демонстрировали меньшее содержание глутатиона, более низкую активность тиоредоксинредуктазы и глутатионпероксидазы, в отличие от культур мезенхимального подтипа. Для дальнейшего исследования вклада антиоксидантных систем в поддержание устойчивости СКГ к терапии нами были подобраны малые интерферирующие РНК (siRNA), направленные на подавление экспрессии генов GPX1 и TXNRD1, и эффективность нокдауна была провалидирована методом ПЦР в реальном времени. Наряду с этим, для Подобрана методика трансфекции клеток сенсором GRX-roGFP2, который будет использован в дальнейших экспериментах

Выводы. Повышенная активность компонентов глутатионовой и тиоредоксиновой систем может способствовать поддержанию редокс-гомеостаза и защите опухолевых клеток от индуцированного терапией окислительного стресса. Дальнейшее изучение роли антиоксидантных механизмов в поддержании жизнеспособности и химиорезистентности СКГ может способствовать выявлению новых молекулярных мишеней и разработке подходов, направленных на повышение эффективности терапии глиобластомы.

Источники и литература

- 1) Kim Y, Varn FS, Park SH, et al. Perspective of mesenchymal transformation in glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):50. Published 2021 Mar 24. doi:10.1186/s40478-021-01151-4;
- 2) Singer E, Judkins J, Salomonis N, et al. Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2015;6(1):e1601. Published 2015 Jan 15. doi:10.1038/cddis.2014.566;
- 3) Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006;172(7):973-981. doi:10.1083/jcb.200601018;