

*А.Б. Данилова, Н.А. Авдонкина, Е.А. Губарева, И.А. Балдуева,
А.Ю. Зозуля, Г.С. Киреева*

Влияние циркадных ритмов на пролиферацию и химиорезистентность культивируемых клеток солидных опухолей

ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Петрова» Минздрава России

Циркадные «часы» — это сложный клеточный механизм, который регулирует множество циклических физиологических процессов. Доклинические, эпидемиологические и клинические исследования показывают связь между нарушением циркадных ритмов и инициацией злокачественного роста. Изучение возможности модуляции биологических свойств клеток солидных опухолей путем нормализации «часовых» механизмов имеет значение в разработке более эффективных подходов химио- и гормонотерапии злокачественных новообразований.

Цель: Оценить *in vitro* влияние синхронизации циркадианных ритмов дексаметазоном на пролиферацию и чувствительность к цисплатину культивируемых клеток опухолей яичника и легкого.

Материалы и методы: Исследование выполнено на культурах метастатического рака яичников ($n=3$) и рака легкого ($n=3$), которые были получены из фрагментов опухолей больных, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Культивирование опухолевых клеток проводили по протоколу, разработанному ранее. Принудительную синхронизацию проводили внесением в клеточные культуры 200 нМ дексаметазона. Использовали цисплатин в концентрации 1,5 и 3 мкг/мл. Анализ пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток осуществляли с помощью клеточного анализатора xCELLigence и системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ.

Результаты: Каждая полученная клеточная линия обладала индивидуальными морфологическими характеристиками и параметрами пролиферативной активности. Предварительная инкубация с дексаметазоном (2 ч) оказывала стимулирующее воздействие на пролиферативную активность опухолевых клеток всех культур: Slope $\min -4,3(0,3) \times 10^{-3}$ — $\max 36,8(0,6) \times 10^{-3}$, $\min 2,2(0,2) \times 10^{-3}$ — $\max 50,4(0,8) \times 10^{-3}$, и уси-

ливалась их чувствительность к цисплатину: $\min -43(2,6) \times 10^{-3}$ — $\max 57,5(0,6) \times 10^{-3}$ и $\min -217,3(2,2) -1,9(0,1) \times 10^{-3}$ — $\max -1,9(0,1) \times 10^{-3}$, соответственно.

Выводы: Синхронизация циркадных ритмов дексаметазоном нескольких клеточных линий рака яичников и легкого позволяла преодолеть изначальную химиорезистентность данных линий и стимулировала противоопухолевое действие цисплатина *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости продолжать комплексные исследования взаимодействия «часовых» механизмов и систем регуляции клеточного цикла и жизнеспособности клеток злокачественных новообразований.

Ключевые слова: циркадные ритмы, клеточные культуры, рак яичников, рак легких, химиорезистентность, дексаметазон

Введение

Циркадные «часы» представляют собой сложный клеточный механизм, который, контролируя экспрессию генов и различные метаболические пути, регулирует множество циклических физиологических процессов [1]. Эпидемиологические и клинические данные показывают связь между нарушением циркадных ритмов и инициацией злокачественного роста, что подтверждается недавними доклиническими исследованиями [2].

Рак легких является основной причиной смертности от злокачественных новообразований во всем мире, для женщин рак яичников занимает 5-е место [3]. В России в структуре онкологической заболеваемости мужского населения опухоли трахеи, бронхов, легкого также занимают лидирующие позиции (16,9%), для женского населения опухоли яичников входят в реестр ведущих локализаций и составляют 4,2% [4].

Несмотря на серьезный прогресс в изучении молекулярных событий, которые способствуют возникновению и прогрессированию опухолей,

по-прежнему, в онкогенезе мало известна роль физиологических факторов риска, таких как нарушение циркадного ритма при сменной работе или нарушениях сна в ночное время. Эпидемиологические исследования показали, что люди, работающие в ночную смену, подвергаются более высокому риску развития рака легкого [5]. М.К. Luo et al. (2014) продемонстрировали связь продолжительности сна и повышенного риска развития рака легких [6].

Имеются данные, свидетельствующие о связи между нарушением циркадных ритмов и риском развития рака яичников. В частности, анализ 28-летних наблюдений показал наличие риска высокой степени для женщин, имеющих ротационный график работы, по сравнению с категорией лиц, выходящих на работу в исключительно дневное время [7].

В клетках млекопитающих суточный ритм экспрессии генов поддерживается благодаря осцилляциям экспрессии часовых генов. Известно, что многие опухолевые гены-супрессоры, а также гены, регулирующие клеточный цикл, ответ на повреждение ДНК, апоптоз и метаболизм находятся под контролем циркадианных «часов». В тоже время показано, что в опухолях нарушается суточная ритмичность экспрессии генов и работа «клеточных часов» [8, 9]. Х.М. Li et al. (2010) установили, что при использовании для синхронизации протокола ограниченного по времени кормления мышей с перевиваемой аденокарциномой поджелудочной железы в опухоли снижалась экспрессия 423 генов, а экспрессия 36 генов приобретала ритмичный характер, кроме того, у мышей этой группы повышалась амплитуда суточных колебаний температуры тела [10]. В ряде других экспериментальных исследований было обнаружено, что принудительная синхронизация циркадианных ритмов в опухолевых клетках *in vitro* и в опухолях *in vivo* замедляет их рост [10–12] а cyclin-dependent kinase (CDK). В частности, применение селициклиба, ингибитора циклин-зависимых киназ, угнетало рост

остеосаркомы Глазго у мышей и индуцировало ритмичную экспрессию часовых и связанных с ними генов в опухолях [12] а cyclin-dependent kinase (CDK).

В исследованиях *in vitro* для синхронизации ритмов в клеточных культурах применяют различные методы: добавление в питательную среду дексаметазона, форсколина или т.н. сывороточный шок — добавление на непродолжительное время большого количества сыворотки [13].

В представленном исследовании целью было оценить *in vitro* влияние синхронизации циркадианных ритмов дексаметазоном на пролиферацию и чувствительность к цисплатину культивируемых клеток опухолей яичника и легкого.

Материалы и методы

В исследовании использовали клеточные линии рака яичников и легких, выделенные из опухолевого материала 6 пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Все образцы опухолей были получены интраоперационно после подписания больными добровольного информированного согласия на забор биологического материала. Характеристика клеточных линий представлена в табл. 1.

Все клеточные линии рака яичников были получены из метастатических образцов: клетки были выделены из асцитической жидкости и плеврального выпота пациенток. Одна клеточная линия рака легких была выделена из образца первичной опухоли, две другие имели метастатическое происхождение. Все пациенты, за исключением одного больного раком легкого, получали лечение, которое предшествовало забору материала, на основе комбинации химиопрепаратов, в составе которых присутствовали препараты платиновой группы.

Выделение и культивирование клеток. После механической дезагрегации тканевых образцов в Медимашине (Agilent Technologies, США) пропускали последовательно клеточную суспензию через систему фильтров Filcon 70 и 50 мкм (BD Bioscience, США), после чего помещали в питательную среду DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащую 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, глутамин (365 мг/л), инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл) (Invitrogen, USA), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) (Sigma Aldrich, США), и непрерывно культивировали при 5% CO₂, 100% влажности во флаконах по методу Freshney [20]. После достижения монослоя клетки пересеивали, используя раствор,

Таблица 1. Характеристика клеточных линий, использованных в исследовании

Клеточная линия	Пациент	Пассаж	Тип опухоли	Гистологическая характеристика	Источник клеток	Предшествующее лечение
#533	О.О.С., 71 г., ♀	64	Рак яичников	Серозная аденокарцинома high grade	Асцитическая жидкость	Полихимиотерапия, нет данных
#1009	В.Р.И., 47 л., ♀	10			Плевральный выпот	Палитаксел+Карбоплатин — 4 цикла. Частичный регресс
#1016	Б.С.А., 47 л., ♀	11			Асцитическая жидкость	Палитаксел+Карбоплатин — 8 циклов. Без эффекта
#988	Б.Л.Н., 70 л., ♀	10	Рак легких	Аденокарцинома	Первичная опухоль	Отсутствует
#1014	П.Н.С., 32 г., ♂	10			Асцитическая жидкость	Пеметрексет+Цисплатин — 4 цикла; Пембролизумаб — 2 цикла. Без эффекта
#1065	К.А.А., 62 г., ♂	5			Плевральный выпот	Эрлотиниб, Осимертиниб, Карбоплатин+Этопозид — 2 цикла. Без эффекта

состоящий из равных долей 0,25% трипсина и 0,02% версена (Биолот, Россия). Культивировали клетки непрерывно не менее 10 пассажей.

Анализ в реальном времени пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток (xCELLigence). Для анализа влияния циркадных ритмов на пролиферативную активность и химиорезистентность культивируемых опухолевых клеток использовали клеточный анализатор xCELLigence (ACEA Bioscience Inc., США). В качестве агента принудительной синхронизации применяли дексаметазон в концентрации 200 нМ. Предварительно клетки рака яичников и рака легких высевали в количестве 2×10^4 и $1,5 \times 10^4$ клеток на лунку, соответственно, в планшеты E-16 (ACEA Bioscience Inc., США). Оставляли планшеты в условиях CO₂-инкубатора на 30 мин. для минимизации турбулентных потоков жидкости, затем помещали в прибор xCELLigence, вели наблюдение в течение 12 ч. Затем в соответствующие лунки вносили дексаметазон в концентрации 200 нМ [21], инкубировали 2 ч и производили замену питательной среды. Использовали химиопрепарат цисплатин в концентрации, соответствующей пику концентрации и 50% от пика концентрации в плазме крови больного: 3 и 1,5 мкг/мл [22]. Общее время наблюдения составило 96 ч. Регистрировали изменения клеточного индекса (CI), который представляет собой соотношение электрического импеданса в «нулевой» точке к импедансу в данной временной точке. Значения CI регистрировали в течение первых трех часов каждые 5 минут, затем в течение всего периода наблюдения — каждые 15 минут. Использовали также параметр Slope, представляющий собой тангенс угла касательной к точкам кривой CI, параметр, ассоциированный со скоростью роста культуры клеток и отражающий скорость изменения CI в выбранный период времени.

Визуализация изображения в системе наблюдения за живыми клетками Cell-IQ. Наблюдение за пролиферативной активностью опухолевых клеток проводили также с помощью автоматического клеточного анализатора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) методом фазового контраста в течение 120 часов. Клетки высевали в количестве 2×10^5 на лунку 6-луночного планшета (Thermo

Fisher Scientific, США) в 3 мл полной питательной среды и оставляли на 12 ч для адаптации к субстрату в условиях CO₂-инкубатора. Затем производили смену среды с внесением соответствующих реагентов и помещали в прибор для наблюдения продолжительностью 120 ч. Для количественной оценки общего числа живых опухолевых клеток создавали специальный протокол на основе библиотеки различных типов клеточных образов, который использовали для качественного и количественного анализа изображений делящихся клеток в режиме реального времени.

Статистическая обработка результатов. Руководствовались статистическими методами, описанными в работе B.S. Everitt, A. Pickles (2004) [23]. Данные по показателю slope представляли в виде средней арифметической и стандартного отклонения (указывали в скобках). Для сравнения величины клеточного индекса в различных вариантах одного опыта рассчитывали процент его уменьшения по сравнению с соответствующим контролем. Статистическую значимость наблюдаемых различий в вариантах опыта оценивали с использованием двустороннего ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки (Grafpad Prizm 8.0)

Результаты

Каждая полученная клеточная линия обладала индивидуальными морфологическими характеристиками и параметрами пролиферативной активности (рис. 1). Тем не менее, при воздействии принудительного синхронизатора циркадных ритмов дексаметазона наблюдали сходную реакцию культивируемых клеток рака яичников и рака легких в пределах индивидуальных различий. Среди культур рака яичников #533 обладала наилучшим ростом и оказалась резистентной к воздействию изучаемых доз цисплатина, но чувствительной к сочетанному воздействию дексаметазона и цисплатина (рис. 2 Б1, Б2).

Таблица 2. Скорость роста культур опухолевых клеток (slope (СКО): $1/ч \times 10^{-3}$) под влиянием принудительной синхронизации дексаметазоном в присутствии цисплатина на 42-52 ч наблюдения

Клет. линия	Без воздействия	Дексаметазон 200 нМ	Цисплатин 3,0 мкг	Дексаметазон 200 нМ + Цисплатин 3,0 мкг/мл
Ср (СКО)				
#533	36,8 (0,6)*	50,4 (0,8)	57,5 (0,6)	-217,3 (2,2)
#1009	-33,8 (1,3)	32,1 (1,5)	-98,0 (3,0)	-119,3 (3,3)
#1016	5,3 (1,3)	14,1 (1,0)	-43,3 (2,6)	-105,0 (2,7)
#988	-0,9 (0,1)	2,6 (0,1)	-4,8 (0,1)	-1,9 (0,1)
#1014	-4,3 (0,3)	3,0 (0,3)	-2,7 (0,3)	-4,5 (0,1)
#1065	-2,8 (0,2)	2,2 (0,2)	-3,8 (0,2)	-7,8 (0,3)

* Приведены средние арифметические, в скобках указано стандартное отклонение

Таблица 3. Показатели клеточного индекса (CI) культур опухолевых клеток, регистрируемого в приборе xCELLigence на 96 ч наблюдения

Клет. линия	Без воздействия	Дексаметазон 200 нМ	Цисплатин 3,0 мкг	Дексаметазон 200 нМ + Цисплатин 3,0 мкг/мл
#533	4,706	4,573 (2,8%)*	5,18 (-10,1%)	0,1158 (97,5%)
#1009	2,489	4,45 (-78,8%)	0,256 (89,7%)	0 (100%)
#1016	2,618	3,946 (-50,7%)	0,637 (75,7%)	0 (100%)
#988	0,279	0,298 (-6,8%)	0,102 (63,4%)	0 (100%)
#1014	0,405	0,906 (-123,7%)	0,275 (32,1%)	0,075 (81,5%)
#1065	0,521	0,567 (-8,8%)	0,314 (39,7%)	0,0027 (99,5%)

*В скобках приведен процент уменьшения CI варианта опыта по сравнению с соответствующим контрольным вариантом

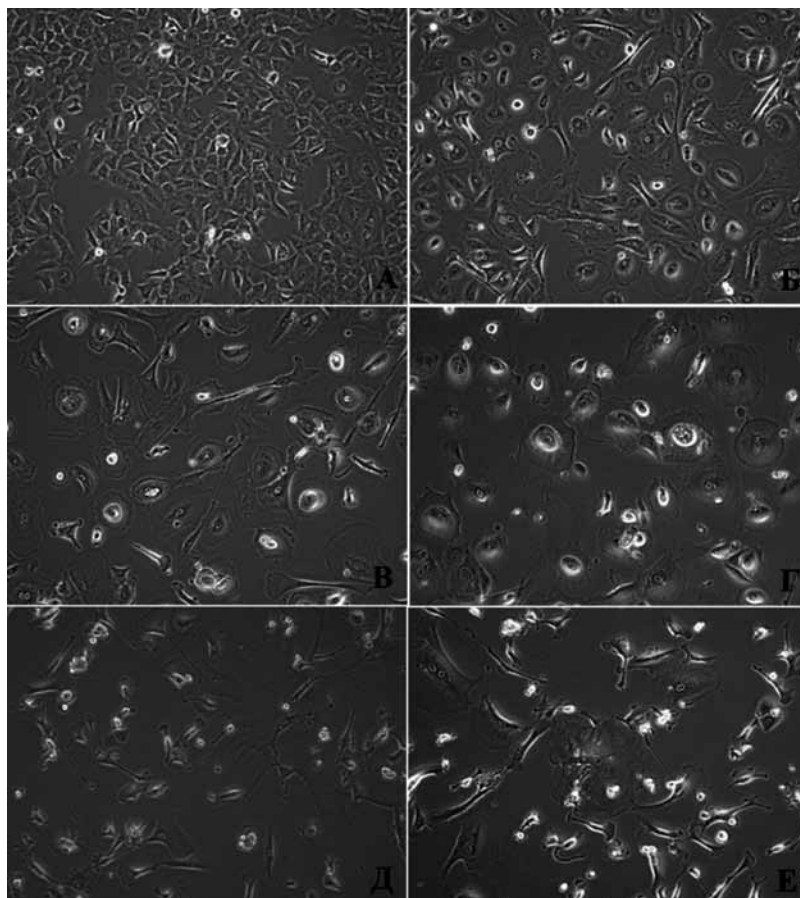


Рис. 1. Морфология клеточных линий рака яичников: А — #533, Б — #1009, В — #1016; клеточных линий рака легки: Г — #988, Д — #1014, Е — #1065. Инвертированный микроскоп, фазовый контраст, x100

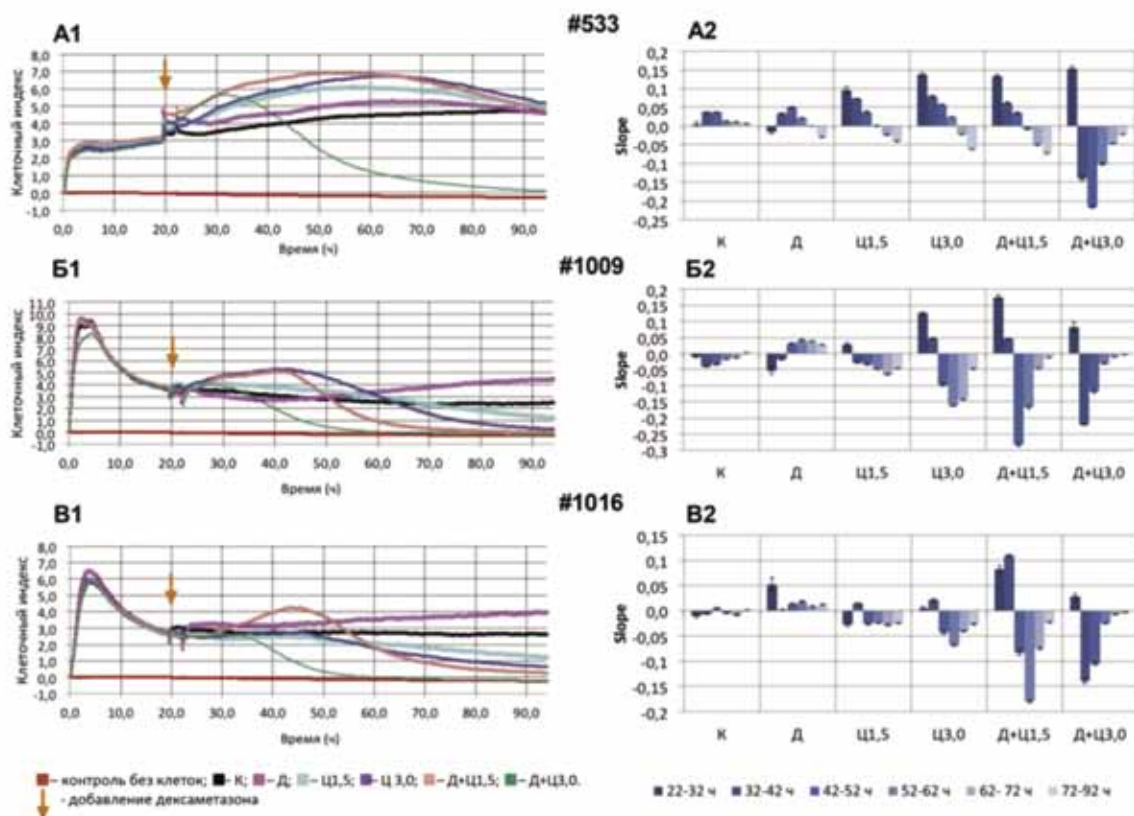


Рис. 2. Графическое изображение результата воздействия дексаметазона и цисплатина в различных концентрациях на пролиферативную активность культивируемых клеток рака яичников. А1, А2 — культура #1016, Б1, Б2 — культура #533, В1, В2 — культура #1009, динамика клеточного индекса и скорости роста культуры за весь период наблюдения (96ч)

Дексаметазон вызвал значительное увеличение скорости роста культуры по сравнению с контрольными показателями: в период наблюдения 42-52 ч slope в культуре при обработке дексаметазоном составил $50,4 (0,8) \times 10^{-3}$, а без воздействия был равен $36,8 (0,6) \times 10^{-3}$ ($p=0,0014$) (табл. 2). В то же время, при сочетанном воздействии дексаметазона и 3,0 мкг/мл цисплатина клеточный индекс (CI), отражающий количество прикрепленных (жизнеспособных) клеток в каждый момент времени, был на 97,5% меньше CI интактного контроля (табл. 3). При использовании меньшей концентрации цисплатина не наблюдали увеличения химиочувствительности после инкубации с дексаметазоном (рис. 2 В1, В2).

Измерение величин Slope, характеризующего скорость изменения CI, ассоциированного со скоростью роста культуры, каждые 10 часов наблюдения, показало, что в контрольных образцах интактной культуры #1016 происходило очень медленное увеличение количества клеток, которое значительно возрастало после инкубации с дексаметазоном (рис. 2 А1, А2). Выявляли химиочувствительность опухолевых клеток #1016, начиная с 40 ч наблюдения, при прямом воздействии цисплатина в концентрациях 1,5 и 3,0 мкг/мл, которая была более выражена после инкубации с дексаметазоном для обеих концентраций. Так, в период наблюдения 42-52 ч slope культу-

ры #1016 без воздействия составил $5,3 (1,3) \times 10^{-3}$, под воздействием 3,0 мкг/мл цисплатина уменьшился до $-43,3 (2,6) \times 10^{-3}$ ($p<0,0001$ по сравнению с контролем), а наименьшие значения ($-105,0 (2,7) \times 10^{-3}$) получены в варианте с сочетанным использованием дексаметазона и 3,0 мкг/мл цисплатина ($p<0,0001$ по сравнению со всеми вариантами опыта) (табл. 2).

Клеточная линия рака яичников #1009 оказалась наиболее чувствительна к цисплатину в модельной системе *in vitro* (рис. 2 В1, В2), что согласуется с клиническими наблюдениями, в соответствии с которыми после первых 4 циклов полихимиотерапии с карбоплатином у больной развился частичный регресс (табл. 1). Предварительная инкубация с дексаметазоном и, затем, с цисплатином приводила к почти полной гибели клеток, в то время как двухчасовая инкубация с дексаметазоном оказывала стимулирующее воздействие на пролиферативную активность (slope в период наблюдения 42-52ч составил $-119,3 (3,3) \times 10^{-3}$ и $32,1 \pm (1,5) \times 10^{-3}$, соответственно ($p<0,0001$)).

Дексаметазон оказывал также стимулирующее воздействие на пролиферацию клеток рака легких, которое было наиболее выраженным случае культуры #1014 (рис. 3 А1, А2, табл. 2 и 3). Согласно параметру Slope предварительная инкубация с дексаметазоном в случае рака легких

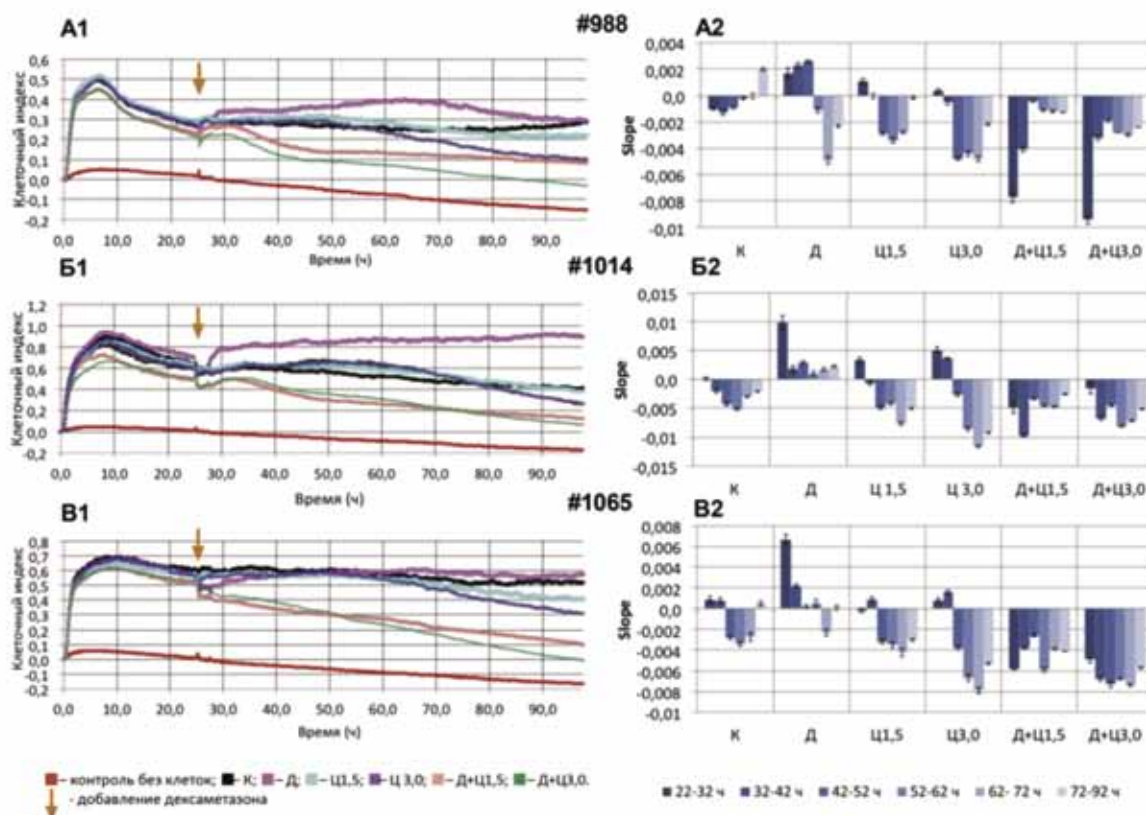


Рис. 3. Графическое изображение результата воздействия дексаметазона и цисплатина в различных концентрациях на пролиферативную активность культивируемых клеток рака легких. А1, А2 — культура #1014, В1, В2 — культура #1065, В1,В2 — культура #988, динамика клеточного индекса и скорости роста культуры за весь период наблюдения (96ч)

также уменьшала резистентность клеточных культур к воздействию цисплатина, наиболее чувствительной к воздействию оказались культуры #988 (рис. 3 В1, В2) и #1065 (рис. 3 В1, В2). На 96 ч наблюдения CI культуры #988 и #1065 после инкубации с дексаметазоном и цисплатином составил 0 и 0,0027, а уменьшение данного показателя по сравнению с контрольными клетками достигало 100% и 99,5% соответственно (табл. 3).

Гибель клеток под воздействием цитостатика после синхронизации циркадных ритмов была

подтверждена при длительном наблюдении в автоматической системе Cell-IQ. Рисунок 4 иллюстрирует наблюдения в начальной (1 ч) и конечной точке (120 ч) на примере клеточной линии аденокарциномы яичников #533.

Таким образом, кратковременная предварительная инкубация с дексаметазоном в течение двух часов оказывала стимулирующее воздействие на пролиферативную активность изучаемых культур клеток рака яичников и легкого, и в тоже время усиливала чувствительность опухолевых клеток к цисплатину.

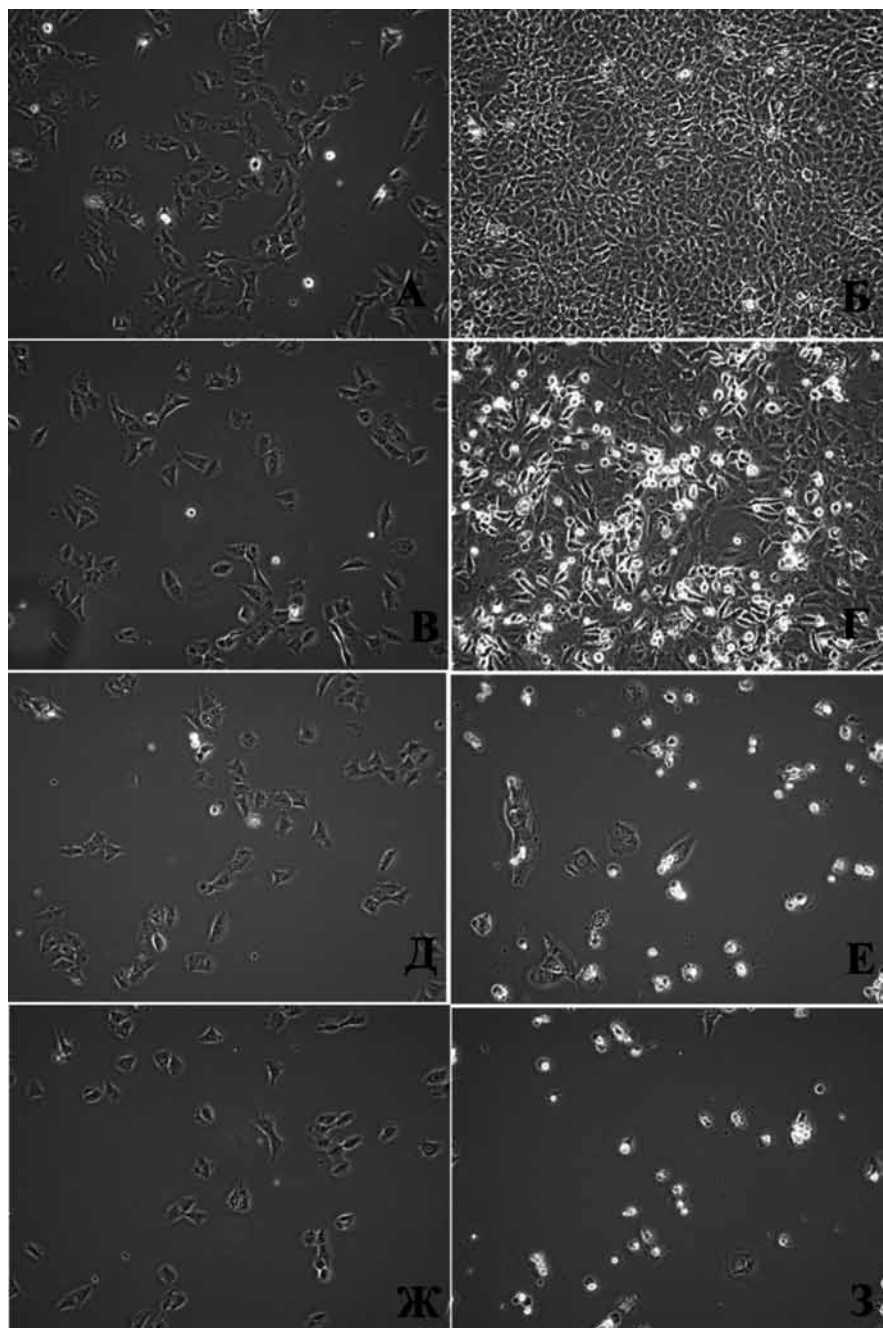


Рис. 4. Визуализация воздействия дексаметазона и цисплатина на клеточную линию рака яичников #533 в системе наблюдения Cell-IQ. А, Б — контроль; В, Г — инкубация с 200нМ дексаметазона; Д, Е — инкубация с 3,0 мкг/мл цисплатина; Ж, З — инкубация с 200нМ дексаметазона и 3,0 мкг/мл цисплатина. А, В, Д, Ж — начало наблюдения, Б, Г, Е, З — 120 ч наблюдения

Обсуждение

В клинических и экспериментальных исследованиях показано, что глюкокортикоиды способны как тормозить, так и стимулировать рост опухолей различной локализации [24]. Основным механизмом действия дексаметазона реализуется через активацию ядерных глюкокортикоидных рецепторов (GR), которые регулируют экспрессию множества генов [25].

В нашей работе мы провели исследования на ранних культурах клеток метастазов рака яичников и легкого, выделенных из организма пациентов, которые получили несколько линий комбинированной химиотерапии, включающей препараты платиновой группы, без достижения клинического эффекта. Таким образом, можно было полагать, что культивируемые опухолевые клетки обладали исходным агрессивным биологическим фенотипом и были химиорезистентны. Мы обнаружили, что двухчасовая преинкубация культур опухолевых клеток с дексаметазоном оказывала стимулирующее воздействие на пролиферативную активность опухолевых клеток после 42 ч наблюдения. Затем, начиная с указанной временной точки эксперимента, происходило усиление чувствительности опухолевых клеток к цисплатину, при этом данные закономерности были статистически значимыми по сравнению с контрольными образцами и сходными для клеток рака яичников и легкого. Интересно, что не наблюдали подобный эффект при постоянной инкубации с дексаметазоном в той же концентрации. В тоже время, имеется достаточно экспериментальных исследований, результаты которых демонстрируют обратные эффекты. В частности, обрабатывая комбинацией цисплатин/гемцитабин в присутствии дексаметазона и без первичные культуры клеток рака легкого, N. Gassler et al. (2005) установили, что дексаметазон способствует выживанию опухолевых клеток [26]. В работе H. Ge et al. (2012) с использованием клеточных культур немелкоклеточного рака легкого было показано, что предварительная обработка дексаметазоном с последующим применением DDP в концентрациях ниже терапевтической, приводит к замедлению процесса старения клеток, регистрируемого по накоплению в клетках β -галактозидазы [19]. В присутствии дексаметазона увеличивалась выживаемость клеток под влиянием цитостатика за счет ослабления степени повреждения ДНК, которую регистрировали по двум маркерам: γ H2AX и 53BP1. В тоже время в монорегиме дексаметазон не оказывал значимого воздействия на пролиферацию опухолевых клеток.

S. Kiessling et al. (2017) удалось показать на культуре клеток мышинной меланомы B16, что

дексаметазон восстанавливает на непродолжительное время молекулярный часовый механизм, регулирующий экспрессию генов, которые, в свою очередь, кодируют регуляторы клеточного цикла [11]. В этом исследовании было установлено, что после обработки дексаметазоном через 24, 36 и 42 ч меньше клеток входило в S-фазу клеточного цикла, что указывает на меньшую репликацию ДНК, в то время как больше клеток было обнаружено в фазах G0 / G1. Интересно, что в нашем исследовании точка наблюдений 42 ч также являлась критической, после которой мы наблюдали изменения пролиферации в контрольных и опытных образцах.

Ранее было установлено, что глюкокортикоиды оказывают проапоптотическое и антипролиферативное действие на малигнизированные клетки лимфопролиферативных заболеваний [27]. Затем рядом исследователей было продемонстрировано на клетках солидных опухолей, что дексаметазон обладает протективным антиапоптотическим действием. В частности, I.V. Runnebaum и A. Brüning (2005) обнаружили, что активация глюкокортикоидных рецепторов клеток рака яичников при индукции апоптоза фактором некроза опухолей способствует их выживанию за счет активации ингибитора каспазы cIAP2 [18]. В клинических условиях лечение дексаметазоном было ассоциировано со значительной активацией cIAP2 в злокачественных клетках, выделенных из асцитной жидкости.

В более позднем исследовании E.M. Stringer-Reasor et al. (2015) на первичных культурах серозной аденокарциномы яичников протестировали воздействие дексаметазона на активность химиопрепаратов и показали, что активация глюкокортикоидных рецепторов приводит к повышенной экспрессии генов *SGK1* и *MKP1/DUSP1*, ответственных за выживание эпителиальных клеток, ингибирует гибель малигнизированных клеток, вызванную карбоплатином/гемцитабином, но, в тоже время не влияет на клеточный цикл [17].

Исследования, направленные на выяснение связей между функционированием «часовых» генов и периодичностью событий клеточного цикла, указывают на наличие сложной взаимной обратной регуляции обеих систем [28]. Для многих линий клеток опухолей человека (рак молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, печени, легкого), которые характеризуются аномальной пролиферацией, показана также аномальная экспрессия циркадных генов [29]. Однако в контексте двунаправленного взаимодействия между «часами» и осцилляторами клеточного цикла сложно определить, какое изменение является причиной или следствием. Вероятно, поэтому результаты исследований

разных научных групп на клеточном и физиологическом уровне носят достаточно противоречивый характер. Можно также предполагать, что различия в эффектах поведения злокачественных клеток под влиянием дексаметазона могут быть вызваны индивидуальными свойствами опухолей конкретных пациентов и тканеспецифической регуляцией транскрипции [26].

Цисплатин образует комплексы с РНК и белками раньше (до проникновения в ядро клетки) и активнее/предпочтительнее, чем ДНК-аддукты. Показано, что с РНК препарат взаимодействует гораздо активнее, чем с ДНК (в 4-20 раз) [30]. Основываясь на наших результатах, мы можем предположить, что **дексаметазон**, восстанавливая синхронную экспрессию генов, индуцирует повышение содержания в цитоплазме клеток различных молекул РНК, которые могут быть мишенью цисплатина, что активизирует гибель клеток под влиянием этого агента после дексаметазон-зависимой синхронизации.

Выводы

В нашем исследовании синхронизация циркадных ритмов дексаметазоном нескольких клеточных линий рака яичников и легкого позволяла преодолеть изначальную химиорезистентность данных линий и стимулировала противоопухолевое действие цисплатина *in vitro*. Необходимы дальнейшие комплексные исследования взаимодействия «часовых» механизмов и систем регуляции клеточного цикла для повышения эффективности стандартных режимов химиотерапии злокачественных новообразований.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-10017)/.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Masri S., Sassone-Corsi P. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms [Internet] // Nature Medicine. Nature Publishing Group. — 2018. — Vol. 24. — P. 1795-803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30523327>.
- Masri S., Kinouchi K., Sassone-Corsi P. Circadian clocks, epigenetics, and cancer // Current Opinion in Oncology. Lippincott Williams and Wilkins. — 2015. — Vol. 27. — P. 50-6.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020 // CA Cancer J Clin. — 2020. — Vol. 70(1). — P. 7-30.
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). — М.: МНИОИ

им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. — 250 с.

- Papagiannakopoulos T., Bauer M.R., Davidson S.M. et al. Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis // Cell Metab. — 2016. — Vol. 24(2). — P. 324-31.
- Luoju M.K., Lehto S.M., Tolmunen T. et al. Sleep duration and incidence of lung cancer in ageing men // BMC Public Health. — 2014. — Vol. 14(1). — P. 295.
- Carter B.D., Ryan Diver W., Hildebrand J.S. et al. Circadian disruption and fatal ovarian cancer // Am J Prev Med. — 2014. — Vol. 46(3 SUPPL. 1). — S34-41.
- Ye Y., Xiang Y., Ozguc F.M. et al. The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy // Cell Syst. — 2018. — Vol. 6(3). — P. 314-328.e2.
- Shostak A. Human Clock Genes and Cancer // Curr Sleep Med Reports. — 2018. — Vol. 4(1). — P. 65-73.
- Li X.M., Delaunay F., Dulong S. et al. Cancer inhibition through circadian reprogramming of tumor transcriptome with meal timing // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70(8). — P. 3351-60.
- Kiessling S., Beaulieu-Laroche L., Blum I.D. et al. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth // BMC Biol. — 2017. — Vol. 15(1). — P. 13.
- Iurisci I., Filipski E., Reinhardt J. et al. Improved Tumor Control through Circadian Clock Induction by Seliciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66(22). — P. 10720-8.
- Xie Y., Tang Q., Chen G. et al. New insights into the circadian rhythm and its related diseases // Front Physiol. — 2019. — Vol. 10. — P. 682.
- Djedovic V., Lee Y.Y., Kollara A. et al. The Two Faces of Adjuvant Glucocorticoid Treatment in Ovarian Cancer // Hormones and Cancer. — 2018. — Vol. 19. — P. 95-107.
- Taylor K.M., Ray D.W., Sommer P. Glucocorticoid receptors in lung cancer: new perspectives // J Endocrinol. — 2016. — Vol. 229(1). — R17-28.
- Wang H-Y., Chang Y-L., Cheng C-C. et al. Glucocorticoids may compromise the effect of gefitinib in non-small cell lung cancer // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7(52). — P. 85917-28.
- Stringer-Reasor E.M., Baker G.M., Skor M.N. et al. Glucocorticoid receptor activation inhibits chemotherapy-induced cell death in high-grade serous ovarian carcinoma // Gynecol Oncol. — 2015. — Vol. 138(3). — P. 656-62.
- Runnebaum IB, Brüning A. Glucocorticoids inhibit cell death in ovarian cancer and up-regulate caspase inhibitor cIAP2 // Clin Cancer Res. — 2005. — Vol. 11(17). — P. 6325-32.
- Ge H., Ni S., Wang X. et al. Dexamethasone Reduces Sensitivity to Cisplatin by Blunting p53-Dependent Cellular Senescence in Non-Small Cell Lung Cancer // PLoS One. — 2012. — Vol. 7(12).
- Freshney R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Gibbs J.E., Beesley S., Plumb J. et al. Circadian timing in the lung; A specific role for bronchiolar epithelial cells // Endocrinology. — 2009. — Vol. 150(1). — P. 268-76.
- Salmon S.E. Cloning of human tumor stem cells: role in cancer treatment and new drug development // Nihon Gan Chiryō Gakkai Shi. — 1982. — Vol. 17(1). — P. 48-65.

23. Everitt B., Pickles A. Statistical aspects of the design and analysis of clinical trials // Imperial College Press. — 2004. — 323 p.
24. Lin K.T., Wang L.H. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment // Steroids. — 2016. — Vol. 111. — P. 84–8.
25. Scheschowitsch K., Leite J.A., Assreuy J. New insights in glucocorticoid receptor signaling—more than just a ligand-binding receptor // Frontiers in Endocrinology. — 2017. — Vol. 8. — P. 16.
26. Gassler N., Zhang C., Wenger T. et al. Dexamethasone-induced cisplatin and gemcitabine resistance in lung carcinoma samples treated *ex vivo* // Br J Cancer. — 2005. — Vol. 92(6). — P. 1084–8.
27. Rutz H.P., Herr I. Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions // Cancer Biology and Therapy. — 2004. — Vol. 3. — P. 715–8.
28. Feillet C., van der Horst G.T.J., Levi F. et al. Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: Implication for healthy cells and malignant growth // Front Neurol. — 2015. — Vol. 6. — P. 96.
29. Fu L., Kettner N.M. The circadian clock in cancer development and therapy. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science // Elsevier B.V. — 2013. — p. 221–82.
30. Hostetter A.A., Osborn M.F., Derose V.J. RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *saccharomyces cerevisiae* // ACS Chem Biol. — 2012. — Vol. 7(1). — P. 218–25.
31. Makovec T. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy // Radiology and Oncology. — 2019. — Vol. 53. — P. 148–58.
32. Theile D. Under-reported aspects of platinum drug pharmacology // J Lipid Res. — 2017. — Vol. 58(3). — P. 529–42.

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.

*A.B. Danilova, N.A. Avdonkina, E.A. Gubareva,
I.A. Baldueva, A.Y. Zozulya, G.S. Kireeva*

Study of effects of circadian rhythms on solid tumor cells proliferation and chemoresistance

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Saint-Petersburg, Russia

Circadian clock is a complex mechanism regulating many different physiological processes. Preclinical, epidemiological and clinical studies demonstrate association between circadian rhythms disruption and tumor initiation. Study of modulation of solid tumor cells biological properties through enhancement of clock mechanisms could attribute to the development of more effective chemo- and hormone therapy approaches.

Aim: Evaluate the effects of ovarian and lung tumor cells synchronization with dexamethasone *in vitro* on cells sensitivity to cisplatin.

Materials and methods: Metastatic ovarian cancer (n=3) and lung cancer (n=3) cell lines were obtained from patients tumors. Tumor cell cultivation was performed in accordance with the protocol. Artificial synchronization was performed with dexamethasone 200 nM introduction to the cell cultures. Doses of cisplatin used were 1.5 and 3.0 µg/ml. xCELLigence Real-Time Cell Analysis and Cell-IQ was used to measure proliferation and chemoresistance of tumor cells.

Results: Each cell-line had individual morphological characteristics and proliferation parameters. Preliminary incubation with dexamethasone (2 h) had a stimulating effect on proliferation of all tumor cell lines (Slope min $-4.3(0.3) \times 10^{-3}$ — max $36.8(0.6) \times 10^{-3}$, min $2.2(0.2) \times 10^{-3}$ — max $50.4(0.8) \times 10^{-3}$), and increased their sensitivity to cisplatin (min $-43(2.6) \times 10^{-3}$ — max $57.5(0.6) \times 10^{-3}$ и min $-217,3(2,2) -1,9(0,1) \times 10^{-3}$ — max $-1,9(0,1) \times 10^{-3}$, respectively).

Conclusion: These results should be the platform for future studies of the interaction of clock mechanisms, cell cycle regulation and viability of tumor cells.

Key words: circadian rhythms, cell cultures, ovarian cancer, lung cancer, chemoresistance, dexamethasone