

ВЫВОДЫ

1. Тромботические эмболы лёгочной артерии имеют морфологические признаки контракции (наличие изменённых эритроцитов характерной формы и перераспределение фибрина в область периферии), свидетельствующие о прижизненном сжатии первичных тромбов и/или тромбоэмболов, что может являться патогенетическим механизмом регуляции кровотока в очаге тромботической окклюзии сосуда.

2. Отсутствие морфологических признаков контракции эмболов может быть или результатом нарушения контракции при жизни, или следствием посмертных изменений по типу аутолиза.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры морфологии и общей патологии Казанского (Приволжского) федерального университета проф. А.П. Киясову и Ф.Ф. Хузину за методическую помощь.

Работа выполнена при поддержке Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета среди мировых научно-образовательных центров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farge D., Debourdeau P., Beckers M. et al. International clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11 (1): 56–70. DOI: 10.1111/jth.12070.

2. Bělohávek J., Dytrych V., Linhart A. Pulmonary embolism, part I: Epidemiology, risk factors and risk stratification, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and nonthrombotic pulmonary embolism. *Exp. Clin. Cardiol.* 2013; 18 (2): 129–138. PMID: 23940438.

3. Konstantinides S.V. ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur. Heart J.* 2014; 35 (43): 3033–3073. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu283.

4. Vidmar J., Serša I., Kralj E., Popovič P. Unsuccessful percutaneous mechanical thrombectomy in fibrin-rich high-risk pulmonary thromboembolism. *Thromb. J.* 2015; 13 (1): 30. DOI: 10.1186/s12959-015-0060-2.

5. Litvinov R.I., Weisel J.W. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis. *ISBT Sci. Ser.* 2016; 12 (1): 176–183. DOI: 10.1111/voxs.12331.

6. Litvinov R.I., Weisel J.W. What is the biological and clinical relevance of fibrin? *Semin. Thromb. Hemost.* 2016; 42 (04): 333–343. DOI: 10.1055/s-0036-1571342.

7. Ząbczyk M., Sadowski M., Zalewski J., Undas A. Polyhedrocytes in intracoronary thrombi from patients with ST-elevation myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2015; 179: 186–187. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.10.004.

8. Cines D.B., Lebedeva T., Nagaswami C. et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood.* 2013; 123 (10): 1596–1603. DOI: 10.1182/blood-2013-08-523860.

9. Penttilä A., Laiho K. Autolytic changes in blood cells of human cadavers. II. Morphological studies. *Forensic Sci. Int.* 1981; 17 (2): 121–132. DOI: 10.1016/0379-0738(81)90004-9.

10. Peshkova A.D., Malyasev D.A., Bredikhin R.A. et al. Contraction of blood clots is impaired in deep vein thrombosis. *BioNanoScience.* 2016; 6 (4): 457–459. DOI: 10.1007/s12668-016-0251-8.

11. Пешкова А.Д., Сайхунов М.В., Дёмин Т.В. и др. Контракция (ретракция) сгустков крови у больных с острым ишемическим инсультом. *Ж. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2016; 116 (3-2): 9–17. [Peshkova A.D., Saykhunov M.V., Demin T.V. et al. Contraction (retraction) of blood clots in patients with ischemic stroke. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2016; 116 (3-2): 9–17. (In Russ.)] DOI: 10.17116/jnevro2016116329-17.

12. Tutwiler V., Litvinov R.I., Lozhkin A.P. et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood.* 2015; 127 (1): 149–159. DOI: 10.1182/blood-2015-05-647560.

УДК 616-006.487: 612.8.01: 615.099.092

© 2018 Хуснутдинов Р.Р., Бойчук С.В.

Роль белков Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы и р53 в ответе клеток нейробластомы на воздействие алкилирующего агента темозоломида

*Рамиль Рамисович Хуснутдинов, Сергей Васильевич Бойчук**
Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-047

Цель. Изучить роль белка р53 и Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы в чувствительности клеток нейробластомы к действию темозоломида.

Методы. Исследование проводили на клеточной линии нейробластомы SK.N.SH, культивируемой в среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков пенициллина-стрептомицина в стан-

дартных условиях (37 °C и 5% CO₂). Клетки инкубировали с алкилирующим агентом темозоломидом в течение 48–72 ч. В ряде случаев осуществляли преинкубацию клеток в течение 2 ч с О6-бензилгуанином (ингибитором О6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы) или нутлином-3а (реактиватором p53). Пролиферативную активность оценивали с помощью системы многопараметрического анализа клеточных культур (RTCA iCELLigence), а также колориметрического MTS-теста. Экспрессию белков определяли методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител.

Результаты. Реактивация белка p53 приводила к значительному снижению скорости пролиферации клеток линии SK.N.SH. Цитотоксический эффект данного препарата более выражен по сравнению с темозоломидом, считающимся препаратом выбора при проведении химиотерапии пациентам с мультиформной глиобластомой и нейробластомой. Ингибирование О6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы также приводило к усилению цитотоксического эффекта темозоломида, тем не менее, цитотоксический эффект химиопрепарата был менее выраженным по сравнению с действием темозоломида на фоне реактивации белка p53.

Вывод. Для оценки чувствительности клеток нейробластомы к действию алкилирующего препарата темозоломида функциональное состояние белка p53 в опухолевых клетках служит более важным прогностическим критерием по сравнению с уровнем экспрессии О6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы; кроме того, реактивация белка p53 приводит к снижению скорости пролиферации клеток нейробластомы линии SK.N.SH и их гибели по механизму апоптоза.

Ключевые слова: p53, О6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, нейробластома, темозоломид, апоптоз.

Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in response of neuroblastoma cells to an alkylating agent temozolomide

R.R. Khusnutdinov, S.V. Boychuk

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To study the role of p53 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in sensitivity of neuroblastoma cells to temozolomide.

Methods. The study was performed on SK.N.SH neuroblastoma cell line cultured in DMEM medium supplemented with fetal bovine serum and antibiotics penicillin-streptomycin in the standard conditions (37°C and 5% CO₂). The cells were cultured with an alkylating agent temozolomide for 48–72 h. For particular experiments, cells were pre-cultured for 2 hours with O6-benzylguanine (a competitive inhibitor of O6-methylguanine-DNA methyltransferase) or nutlin-3a (reactivator of p53). Proliferative activity was evaluated by using a system of multiparametric analysis of cell cultures (RTCA iCELLigence) as well as MTS-based colorimetric assay. Protein expression was measured by Western blotting by using the corresponding monoclonal antibodies.

Results. Reactivation of p53 protein substantially inhibited proliferation rate of SK.N.SH cells. Cytotoxic effect of a medication was more significant compared to temozolomide considered as an agent of choice for chemotherapy for patients with glioblastoma multiform or neuroblastoma. Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase also enhanced the cytotoxic effect of temozolomide, however, cytotoxic effect of a chemotherapeutic agent was less expressed compared to temozolomide, along with p53 reactivation.

Conclusion. Functional state of p53 protein in tumor cells is a more important prognostic marker of neuroblastoma cells' sensitivity to an alkylating agent temozolomide compared to O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression; in addition, reactivation of p53 protein induces the decrease of proliferation rate of neuroblastoma SK.N.SH cells and their death via apoptosis.

Keywords: p53, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, neuroblastoma, temozolomide, apoptosis.

Нейробластомы — разновидность солидных злокачественных новообразований, возникающих из эмбриональных нейробластов симпатической нервной системы. Это наиболее частая экстракраниальная солидная бластома, встречающаяся у детей, составляющая до 14% всех новообразований детского возраста [1]. Агрессивный характер роста опухоли и её резистентность к большинству современных химиопрепаратов — главные факторы, определяющие неблагоприятный прогноз заболевания. Выживаемость детей с тяжёлой формой нейробластомы составляет всего 34%, несмотря на применение агрессивных форм лечения [2].

Темозоломид (ТМЗ) — алкилирующий агент, представляющий собой липофильное

пролекарство. Служит препаратом выбора для проведения химиотерапии пациентам с некоторыми типами злокачественных новообразований, например мультиформной глиобластомой, а также нейробластомой. Это обусловлено, в частности, способностью препарата проходить через гематоэнцефалический барьер и индуцировать повреждение (алкилирование) молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), в результате чего происходит образование одно- и двунитевых разрывов, приводящих в конечном счёте к запуску программы апоптоза и/или клеточного старения в опухолевых клетках [3].

Внедрение данного препарата в практическую онкологию позволило улучшить

прогноз заболевания и повысить медиану выживаемости у пациентов с мультиформной глиобластомой. К примеру, было показано, что медиана выживаемости для пациентов, в отношении которых применяли лучевую терапию в сочетании с ТМЗ, составляла 15 мес, в то время как без лечения данный показатель обычно не превышает 5–6 мес [4, 5]. Аналогичным образом были получены данные, подтверждающие высокую эффективность использования ТМЗ у пациентов с рецидивирующими и рефрактерными формами нейробластом [6, 7].

Тем не менее, неоднородность ответа вышеуказанных злокачественных новообразований на воздействие данного алкилирующего агента, обусловленная отсутствием чётко обозначенных молекулярных диагностических маркеров, определяющих чувствительность/резистентность вышеназванных опухолей в ответ на проведение химиотерапии ТМЗ, продолжает оставаться актуальной проблемой как для экспериментальной, так и для практической онкологии.

В настоящее время существует несколько точек зрения о формировании молекулярных механизмов резистентности нейробластом к действию ТМЗ. Одним из наиболее общепризнанных является уровень экспрессии в опухоли фермента Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), способной перемещать ТМЗ-индуцированный алкильный радикал с гуанина на остаток цистеина в своём активном центре, тем самым обеспечивая эффективную репарацию вышеуказанных повреждений ДНК [8]. Тем не менее, результаты исследований последних лет показали отсутствие выраженной корреляции между уровнем экспрессии MGMT в опухолевых клетках и их ответом на воздействие алкилирующих агентов, в частности ТМЗ [9].

Другой фактор, способный оказать влияние на формирование резистентности опухолевых клеток к ТМЗ, — функциональная активность системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК (MMR-mismatch repair), включающей целый спектр белков, в первую очередь MSH2 и MSH6. Данная система репарации повреждений ДНК имеет большое значение для поддержания контроля «правильности» процессов репликации ДНК и активации соответствующих сигнальных путей при повреждениях ДНК. В исследованиях некоторых авторов была обнаружена корреляционная

зависимость между нарушениями в данной системе репарации повреждений ДНК и повышением устойчивости клеток глиобластом к воздействию ТМЗ [10].

Кроме того, важным диагностическим маркером, способным, на наш взгляд, определять характер ответа опухолевых клеток на воздействие ТМЗ, служит функциональная активность гена-онкосупрессора *TP53*. Белок p53, кодируемый одноимённым геном, является ключевым регулятором множества клеточных процессов, в числе которых апоптоз, активация так называемых «чек-пойнтов» и остановка клеток в одной из фаз клеточного цикла, клеточное старение [11]. К примеру, у пациентов с мультиформной глиобластомой мутации данного онкосупрессора бывают достаточно частой находкой и обнаруживаются более чем у трети пациентов [12], что, на наш взгляд, может являться фактором, определяющим гетерогенность ответа пациентов с данным заболеванием на проведение химиотерапии ТМЗ.

Целью нашего исследования было определение прогностической значимости уровней экспрессии и функционального состояния всех вышеуказанных факторов (MGMT, элементов системы MMR и функционального состояния белка p53) в ответе опухолевых клеток нейробластомы на воздействие алкилирующего агента ТМЗ.

Исследования проведены на клеточной линии SK.N.SH (ATCC, США). Клетки культивировали в стандартных условиях (37 °C и 5% CO₂) в культуральной среде DMEM (ПанЭко) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) и антибиотиков пенициллина-стрептомицина (Sigma). Клетки подвергали воздействию алкилирующего агента ТМЗ (Sigma) в отдельности, а также в комбинации со специфическим ингибитором MGMT — Об-бензилгуанином (Sigma) и реактиватором p53 — нутлином-3а (Sigma) в концентрациях 30 и 10 мкМ соответственно.

Уровень экспрессии белков определяли методом вестерн-блоттинга. Клеточные экстракты получали посредством лизиса клеток в радиоиммунопреципитационном буфере с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Образцы (30 мкг) разделяли в 7,5 и 12% полиакриламидных гелях и переносили на нитроцеллюлозную мембрану посредством влажного трансфера. Инкубацию с первичными моноклональными антителами к белку p53 (общей

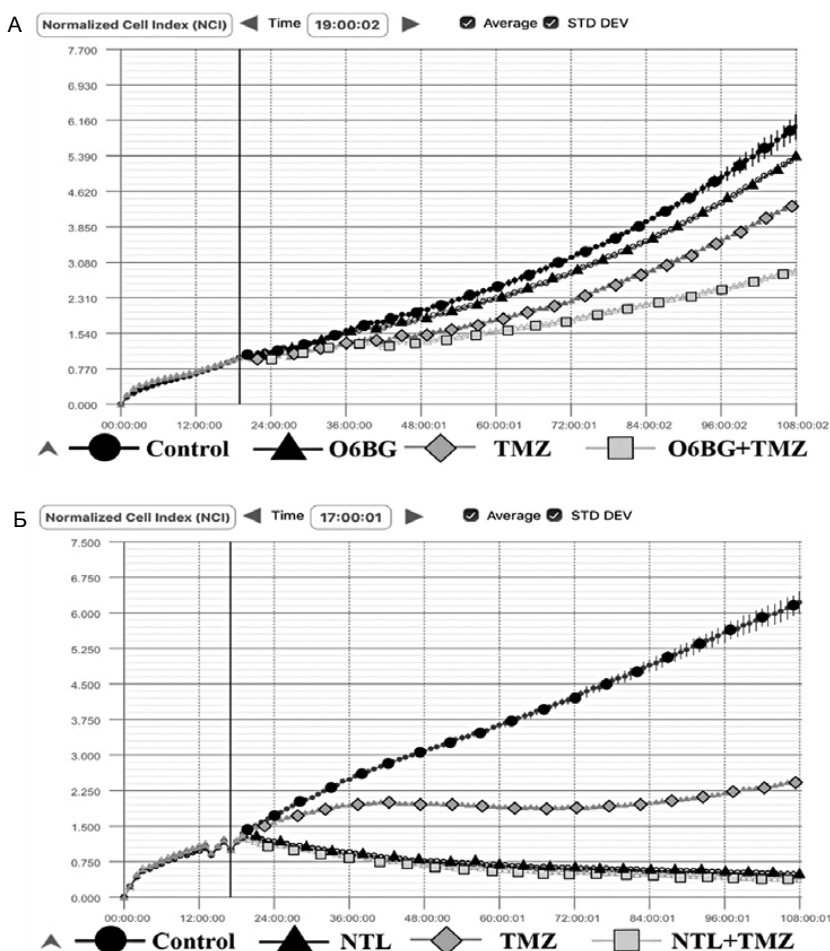


Рис. 1. Пролиферативная активность клеток в условиях преинкубации в течение 2 ч с О6-бензилгуанином (О6BG; А) и нутилином (NTL; Б) и последующим добавлением темозоломида (TMZ) в концентрации 200 мкМ

и фосфорилированной формах; Santa Cruz Biotechnology), MGMT (Abcam), MSH2, MSH6 и маркёру апоптоза (расщеплённой форме каспазы-3; Cell Signaling) проводили при 4 °С в течение 16 ч. Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Santa Cruz Biotechnology), добавляли в концентрации 1:1000, после чего мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и визуализировали с посредством хемилюминесценции (Vilber Lourmat).

Для оценки жизнеспособности клетки заседали в 96-луночный планшет в концентрации $3,2 \times 10^4$ в лунку и через 24 ч подвергали инкубации с вышеуказанными соединениями в отдельности, а также в комбинации с химиопрепаратом TMZ. Спустя 48–72 ч культивирования клеток проводили

колориметрический MTS-тест с использованием реагента CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega) на планшетном анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific).

Пролиферативную активность опухолевых клеток оценивали с помощью системы многопараметрического анализа клеточных культур RTCA iCELLigence (ACEA, Biosciences). Для этого клетки в концентрации 5×10^4 заседали в 8-луночные планшеты и подвергали дальнейшему анализу.

На начальном этапе нашего исследования была проанализирована пролиферативная активность опухолевых клеток в условиях инкубации с вышеуказанными препаратами в отдельности, а также при их комбинированном использовании. Ожидается TMZ оказывал умеренный ингибирующий эффект

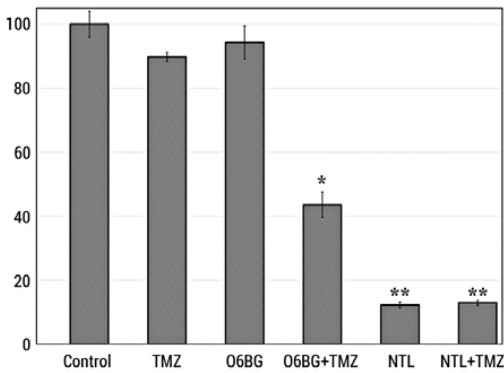


Рис. 2. Цитотоксичность алкилирующего агента темозоломида (TMZ) в отдельности и в сочетании с ингибитором Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (Об-бензилгуанином — O6BG) и реактиватором p53 (нутлином — NTL)

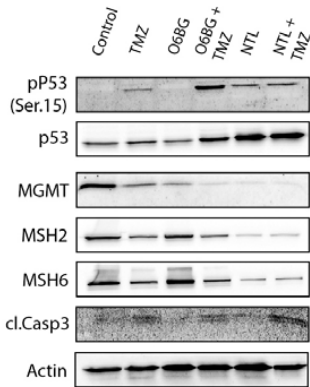


Рис. 3. Уровни экспрессии белка Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), p53 и его фосфорилированной формы (pP53Ser15), белков системы MMR (MSH2 и MSH6), расщеплённой формы каспазы-3 (cl.casp3) в условиях инкубации с темозоломидом (TMZ), нутлином-3а (NTL), Об-бензилгуанином (O6BG), а также их комбинацией в течение 72 ч

в отношении роста опухолевых клеток (рис. 1). Примечательно, что ингибирование MGMT при помощи Об-бензилгуанина приводило к усилению эффекта TMZ, при этом сам Об-BG ингибирующего эффекта на пролиферативную активность опухолевых клеток не оказывал (см. рис. 1, А). Было обнаружено значительное подавление скорости пролиферации опухолевых клеток в условиях реактивации белка-онкосупрессора p53 с помощью нутлина-3а (см. рис. 1, Б).

Результаты колориметрического MTS-теста подтвердили значительное усиление гибели клеток нейробластомы в условиях реактивации белка p53. Также было показано

усиление цитотоксического эффекта TMZ в отношении клеток нейробластомы на фоне предварительного ингибирования активности MGMT в опухолевых клетках (рис. 2).

Следующим этапом исследования было изучение уровней экспрессии вышеуказанных факторов в опухолевых клетках. Результаты иммуноблоттинга выявили значительное увеличение уровня экспрессии общей формы белка p53, что коррелировало с уменьшением скорости пролиферации клеток (рис. 3). Экспрессия белков MGMT, MSH2 и MSH6, напротив, уменьшалась.

Примечательно, что при воздействии химиопрепарата TMZ в отдельности и, особенно, на фоне комбинированного воздействия данного химиопрепарата и ингибитора MGMT происходила выраженная активация белка p53, о чём свидетельствовало повышение уровня экспрессии фосфорилированной формы данного белка. При этом различия в уровнях экспрессии вышеуказанных факторов не были обусловлены различной «белковой нагрузкой» в исследуемых лизатах опухолевых клеток, что подтверждалось одинаковым уровнем экспрессии белка актина во всех исследованных образцах.

Важно отметить, что нами также было обнаружено значительное усиление гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза в условиях реактивации белка p53 и/или ингибирования MGMT при наличии повреждений ДНК, индуцированных TMZ. Об этом свидетельствовало усиление уровня экспрессии расщеплённой формы каспазы-3, служащей общепризнанным маркером гибели клеток по механизму апоптоза. При этом максимальное усиление гибели клеток происходило в условиях комбинированного воздействия химиопрепарата и реактиватора белка p53 (см. рис. 3).

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой цитотоксической активности нутлина-3а в отношении опухолевых клеток нейробластомы линии SK.N.SH. Важно отметить, что цитотоксический эффект данного препарата был более выражен по сравнению с эффектом алкилирующего агента TMZ, рассматриваемого в настоящее время в качестве «золотого стандарта» при проведении химиотерапии больным с некоторыми типами злокачественных новообразований нервной системы, в частности мультиформной глиобластомой. Более того, нами было обнаружено усиление гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза

в условиях комбинированного воздействия вышеуказанных препаратов.

Известно, что основным механизмом действия нутлина-3а является реактивация p53, что в условиях повреждений ДНК может приводить к остановке клеточного цикла в фазах G1 и G2. Это, по мнению некоторых авторов, может оказывать цитопротективное действие на нетрансформированные клетки при проведении химио- и радиотерапии [13–15]. При этом одним из механизмов, регулирующих продвижение клеток по фазам клеточного цикла, считается активация ингибитора пан-циклин-зависимой киназы p21 [16].

Кроме того, некоторыми исследователями в опухолевых клетках глиобластом при воздействии TMZ были обнаружены признаки активации программы клеточного старения, о чём, в частности, свидетельствовал высокий уровень экспрессии β-галактозидазы, служащей общепризнанным маркером данного процесса. По мнению большинства исследователей, остановка клеточного цикла и реализация программы клеточного старения в условиях реактивации белка p53 являются наиболее вероятными по сравнению с запуском программы апоптоза [17–18].

Тем не менее, результаты наших исследований показывают отсутствие морфологических признаков, характерных для клеточного старения, в клетках, подвергнутых воздействию алкилирующего агента TMZ как в отдельности, так и в условиях реактивации белка p53. Более того, усиление уровня экспрессии расщеплённой формы каспазы-3 свидетельствует об обратном: запуск программируемой клеточной гибели является преобладающим процессом по сравнению с остановкой процессов клеточного деления и старения. Подобные различия могут быть обусловлены молекулярно-фенотипическими особенностями различных клеточных линий глио- и нейробластом, используемых различными исследовательскими группами.

В настоящем исследовании была использована клеточная линия SK.N.SH, которая имеет «дикий» тип p53 и MGMT, что, на наш взгляд, позволило наиболее корректно оценить влияние данных факторов в отношении чувствительности опухолевых клеток к алкилирующему соединению TMZ.

Таким образом, в результате проведённых исследований были получены данные о том, что опухолевые клетки

нейробластомы линии SK.N.SH в малой степени чувствительны к воздействию TMZ. При этом преинкубация клеток со специфическим ингибитором белка MGMT приводила к усилению эффекта химиопрепарата. Важно отметить, что наиболее выраженное подавление роста опухолевых клеток происходило в условиях реактивации белка p53, при которых клетки практически теряли свою пролиферативную активность. Нами также было отмечено значительное снижение уровня экспрессии белка MGMT в данных экспериментальных условиях, что может свидетельствовать об отрицательной обратной связи между данными факторами.

ВЫВОД

Основным выводом, полученным в результате проведённых исследований, следует считать получение доказательств о преобладающей роли оценки функционального статуса белка p53 в качестве предиктора ответа опухолевых клеток нейробластом на воздействие алкилирующего агента темозоломида. В свою очередь уровень экспрессии и функциональную активность фермента Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы следует расценивать как менее значимые параметры для оценки восприимчивости нейробластом к действию темозоломида.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) №14-15-00342.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schwab M., Westermann F., Hero B., Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol.* 2003; 4 (8): 472–480. DOI: 10.1016/S1470-2045(03)01166-5.
2. Brodeur G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3 (3): 203–216. DOI: 10.1038/nrc1014.
3. Günther W., Pawlak E., Damasceno R. et al. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br. J. Cancer.* 2003; 88 (3): 463–469. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600711.
4. Johnson D.R., O'Neill B.P. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J. Neuro-Oncol.* 2012; 107 (2): 359–364. DOI: 10.1007/s11060-011-0749-4.
5. Krex D., Klink B., Hartmann C. et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007; 130 (Pt. 10): 2596–2606. DOI: 10.1093/brain/awm204.

6. De Sio L., Milano G.M., Castellano A. et al. Temozolomide in resistant or relapsed pediatric solid tumors. *Pediatr. Blood Cancer*. 2006; 47 (1): 30–36. DOI: 10.1002/pbc.20516.
7. Rubie H., Chisholm J., Defachelles A.S. et al. Société Française des Cancers de l'Enfant, United Kingdom Children Cancer Study Group-New Agents Group Study: Phase II study of temozolomide in relapsed or refractory high-risk neuroblastoma: a joint Société Française des Cancers de l'Enfant and United Kingdom Children Cancer Study Group-New Agents Group Study. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 5259–5264. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.1572.
8. Pegg A.E. Properties of mammalian O6-alkylguanine-DNA transferases. *Mutat. Res.* 1990; 233: 165–175. DOI: 10.1016/0027-5107(90)90160-6.
9. Ramalho-Carvalho J., Pires M., Lisboa S. et al. Altered Expression of MGMT in high-grade gliomas results from the combined effect of epigenetic and genetic aberrations. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e58206. DOI: 10.1371/journal.pone.0058206.
10. Goellner E.M., Grimme B., Brown A.R. et al. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD⁺ biosynthesis and base excision repair. *Cancer Res.* 2011; 71 (6): 2308–2317. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3213.
11. Itahana K., Dimri G., Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 2784–2791. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02228.x.
12. Chin L., Meyerson M., The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008; 455: 1061–1068. DOI: 10.1038/nature07385.
13. Ingeborg M.M. van Leeuwen, Bhavya Rao, Marijke C.C. Sachweh, Lain S. An evaluation of small-molecule p53 activators as chemoprotectants ameliorating adverse effects of anticancer drugs in normal cells. *Cell Cycle*. 2012; 11 (9): 1851–1861. DOI: 10.4161/cc.20254.
14. Apontes P., Leontieva O.V., Demidenko Z.N. et al. Exploring long-term protection of normal human fibroblasts and epithelial cells from chemotherapy in cell culture. *Oncotarget*. 2011; 2: 222–233. DOI: 10.18632/oncotarget.248.
15. Carvajal D., Tovar C., Yang H. et al. Activation of p53 by Mdm2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res.* 2005; 65: 1918–1924. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3576.
16. Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993; 366 (6456): 701–704. DOI: 10.1038/366701a0.
17. Tovar C., Rosinski J., Filipovic Z. et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: Implications for therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103 (6): 1888–1893. DOI: 10.1073/pnas.0507493103.
18. Villalonga-Planells R., Coll-Mulet L., Martinez-Soler F. et al. Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. *PLoS One*. 2011; 6 (4): e18588. DOI: 10.1371/journal.pone.0018588.

УДК 616-018: 612.683

© 2018 Шаповалова Е.Ю. и соавторы

Морфологическая характеристика заживления ишемизированной экспериментальной раны после применения ауто- и гетерофибробластов и дермального эквивалента

Елена Юрьевна Шаповалова*, Татьяна Анатольевна Бойко,
Юрий Геннадиевич Барановский, Игорь Анатольевич Лугин

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь, Россия

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-053

Цель. Изучить морфологическое строение, коллагенообразование и ангиогенез в биоптатах новообразованного эпидермиса и дермы на 19-е сутки их восстановления в экспериментальной ишемизированной ране после введения ауто- и гетерофибробластов, а также после трансплантации дермального эквивалента с гетерофибробластами.

Методы. Исследование выполнено на 28 белых половозрелых мышцах линии C57/Bl в возрасте до 1 года. Вокруг и в дно хирургической экспериментальной кожной раны в лопаточной области вводили 0,4 мл взвеси фибробластов и дермальный эквивалент в количестве 1,33 млн клеток. Биоптат заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином и по Вейгерту–Ван-Гизону.

Результаты. Наиболее существенно на регенераторный гистогенез влияет введение аутофибробластов, когда фиксируется наибольшая толщина эпидермиса, наиболее активны ангиогенез и коллагенообразование. Вместе с тем, самым дифференцированным эпидермис становится после трансплантации в рану дермального эквивалента с гетерофибробластами.

Вывод. Благоприятное воздействие дермального эквивалента с гетерофибробластами отличается от воздействия