

УДК 616-006.04:277.3

Л. Гарманчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЕПІДЕРМАЛЬНИЙ ФАКТОР РОСТУ ПІДСИЛЮЄ ЦИТОТОКСИЧНИЙ/ЦИТОСТАТИЧНИЙ ЕФЕКТ НІМОТУЗУМАБУ ТА ПРОАПОПТИЧНУ ДІЮ β -D-КСИЛОФУРАНОЗИДУ НА КЛІТИНИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Оцінено ефективність комбінованого впливу на пухлинні клітини раку молочної залози лінії MCF-7 антитіл до рецептора епідермального фактору росту – німотузамабу, синтетичної сполуки – β -D-ксилофуранозиду (Nu-13, глікозидний аналог 6-азацитидину) в поєднанні з мітогеном епідермальним фактором росту. Показано, що ЕФР підсилює цитотоксичну/цитостатичну дію німотузамабу, та проапоптичну Nu-13.

Ключові слова: пухлинні клітини, рак молочної залози, епідермальний фактор росту.

Вступ. Стратегії комбінованої терапевтичної проти-пухлинної дії на сьогодні включають вплив на різні молекулярні та клітинні мішені, які задіяні в прогресії новоутворень і є нечутливими до проапоптичних ендогенних та екзогенних сигналів [1-2]. Найбільш вивченим механізмом пригнічення апоптозу, який лежить в основі пухлинної трансформації, є аутокринне і паракринне підвищення експресії ростових факторів і/чи рецепторів до них в клітинах пухлинного клону. Більшість пептидних факторів росту проявляють мітогенні властивості і можуть діяти в аутокринних і/чи паракринних метаболічних петлях, визначаючи ступінь злоякісності пухлин [3-5]. Рецептори з тирозинкіназною активністю, індукція яких специфічними мітогенами відбувається переважно за аутокринним механізмом за пухлинного росту, є однією із головних мішеней селективної направленої проти-пухлинної терапії [2, 6]. РЕФР – тирозинкіназний рецептор епідермального фактору росту, функціональна роль котрого пов'язана з адгезією, проліферацією та міграцією клітин [6-8]. Порушення взаємодій у системі ліганд-РЕФР приводить до посилення експресії клітинних протоонкогенів. Підвищена експресія РЕФР спостерігається у 30% карцином людини і корелює з рівнем пухлинної інвазії та метастазування [7,8]. Зокрема вважають, що ErbB1 відіграє важливу роль у розвитку раку легень і товстої кишки, а ErbB2 (або HER2) слугує потужним онкогеном, задіяним у патогенезі раку молочної залози [9]. Тому пригнічення експресії рецепторів родини РЕФР на сьогодні є одним із широко використовуваних прийомів проти-пухлинного впливу. Прикладом таргетної терапії, мішенню якої є система ліганд-РЕФР, є застосування герцептину – гуманізованих моноклональних антитіл до рецептора ЕФР другого типу (Erb B II/Her 2 neu) [9-12]. Таргетна проти-пухлинна терапія зазначеної спрямованості включає блокування рецепторів специфічними моноклональними антитілами, інгібування тирозинкіназ цих рецепторів, використання кон'югатів "ліганд-токсин" з цитотоксичною активністю, неспецифічне блокування рецепторів антагоністами, використання антисенсорних олігонуклеотидів, направлених на регуляцію експресії рецепторів або їх лігандів [8-10]. Одним із перспективних напрямків вирішення проблеми пригнічення проліферації злоякісно трансформованих клітин є розробка кон'югатів цитотоксичних препаратів з векторними поліпептидами [13]. Вибірковість транспорту в даному випадку досягається за рахунок здатності ліганду (вектора) до високоафінного зв'язування із специфічними рецепторами, експресованими лише/переважно на клітинах-мішенях. Однак, створення лікарських форм препаратів на основі таких кон'югатів потребує додаткових технологічних розробок, дослідження їх фармакодинаміки, фармакокінетики, тощо. З іншого боку, суттєвою проблемою в проти-пухлинній терапії є клітини пухлин, що знаходяться в G₀-фазі клітинного циклу, оскільки біодоступність до них як хіміопрепаратів, так і гуманізованих антитіл є ниж-

чою, ніж до клітин проліферативного пулу (S+G₂/M). Тому розробляються додаткові підходи щодо застосування сполук, які можуть синхронізувати пухлинні клітини в синтетичній фазі (S), чутливість яких висока до проти-пухлинних препаратів, що є інтерколяторами ДНК; до антибулінових препаратів (G₂-M перехід); підвищувати чутливість до р53-індукованого апоптозу та ін. Саме тому, в даному експерименті в якості екзогенного стимулятора синтезу ДНК в клітинах MCF-7 (аденокарцинома молочної залози) з високим рівнем експресії РЕФР було використано ліганд РЕФР – ЕФР та оцінено його вплив на клітини в поєднанні з новосинтезованою сполукою – глікозидним аналогом 6-азацитидину - β -D-ксилофуранозидом (Nu-13), що проявила виражений цитотоксичний/антипроліферативний ефект до цих клітин [14] та німотузамабом (НТМ) – проти-пухлинним препаратом, вплив якого індукується шляхом інгібування кіназ-залежного фосфорилування РЕФР, що призводить до зупинки клітинного циклу в G₁ фазі. Отже, **мета** роботи полягала у визначенні цитотоксичного/цитостатичного, проапоптичного впливу НТМ, та Nu-13 у поєднанні з ЕФР по відношенню до клітин MCF-7.

Матеріали та методи досліджень. Клітини MCF-7 інкубували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріонального телячого сироватки (ЕТС, Sigma, США), 2мМ L-глутаміна та 40 мкг/мл гентаміцину за стандартних умов при 37°C та 5% CO₂. Досліджувані сполуки додавали до клітин, що досягали 70-80% моношару. У випадку визначення комбінованого впливу, ЕФР вносили в середовище інкубації в концентрації 5 нМ за півгодини до внесення Nu-13 або НТМ. Nu-13 титрували в діапазоні концентрацій 10⁻⁶-10⁻³ М. НТМ використовували у лікарській формі (терапевтична доза складає 150 мг/м² за введення 1 раз на тиждень – або у нашому випадку із розрахунку на 100 тис кл/мл інкубаційного середовища – 1,5 мкг НТМ). Цитотоксичний/цитостатичний, антипроліферативний ефект та життєздатність клітин визначали в МТТ-тесті [15, 16] за включенням в живі клітини розчинного в фізіологічних буферах барвника 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2-тетразоліум броміду та перетворення його мітохондріальними дегідрогеназами в нерозчинні кристали форми фармачеу фіолетового кольору. Після розчинення останніх в диметилсульфоксиді, концентрацію живих клітин визначали за інтенсивністю забарвлення розчину в колориметричному аналізі при довжині хвилі 570 нм. Співвідношення живих та мертвих клітин, за включенням в останні барвника трипанового синього, визначали рутинним підрахунком в камері Горяєва. Розподіл пухлинних клітин згідно фаз клітинного циклу та відносну кількість апоптичних клітин аналізували методом проточної цитофлуориметрії [17]. Субстратну залежність та морфологію клітин було оцінено після зафарбовування клітин фіолетовим кристалічним як описано нами раніше [18]. Досліджувані показники визначали після 48 годинної інкубації клітин з агентами.

Як контроль використовували клітини, які інкубували за таких же умов без агентів. Цитотоксичний ефект визначали за відсотком мертвих клітин, цитостатичний – відносним вмістом клітин в G_0 -фазі та концентрацією живих клітин відносно контролю. Субстратну залежність визначали за концентрацією прикріплених клітин до субстрату. Статистичний аналіз проводили за t-критерієм, достовірно значимими вважали відмінності при $P < 0.05$

Результати та їх обговорення. Як свідчать наведені дані, цитотоксичний/цитостатичний ефект НТМ в комбінації з ЕФР по відношенню до клітин MCF-7 становив 56% ($p < 0,05$) відносно контролю, в той час як додавання НТМ призводило до зменшення вмісту живих клітин, порівняно з контролем на 45% ($p < 0,05$); (рис.1).

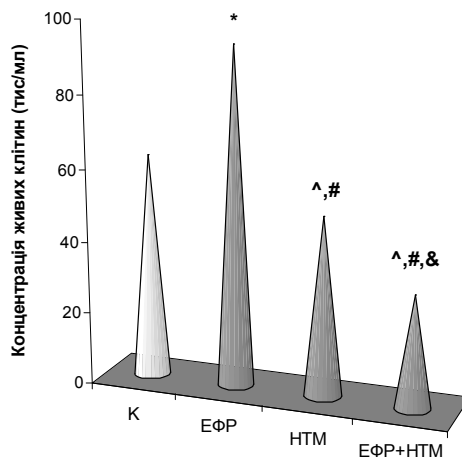


Рис.1. Вміст живих клітин MCF-7 за впливу німотузамабу (НТМ), та НТМ в комбінації з ЕФР. Термін інкубації клітин з агентами та в контролі – 48 годин

* – $P < 0.05$, порівняно з контролем; [^] – $P < 0.05$, порівняно з НТМ; & – порівняно з ЕФР

Як видно з наведених даних, концентрація живих клітин, визначена за рутинним підрахунком та в МТТ-тесті, за впливу НТМ знизилась в 1,2 рази ($P < 0.05$) проти контролю, тоді як за спільного впливу НТМ та ЕФР цей показник був нижчим вдвічі ($P < 0.05$) проти контролю і в 1,6 рази ($P < 0.05$) проти НТМ, та майже втричі –

порівняно з дією ЕФР. Такий же ефект по відношенню до клітин MCF-7 спостерігався за комбінованої дії Nu-13 з ЕФР: – інкубація клітин з Nu-13 в концентраціях 0,064, 0,016, 1 та 4 мМ та передінкубацією з ЕФР в концентрації 5 нМ, характеризувалась підсиленням цитотоксичного ефекту в середньому на $21,4 \pm 3,1\%$ ($P < 0.05$) (рис.2).

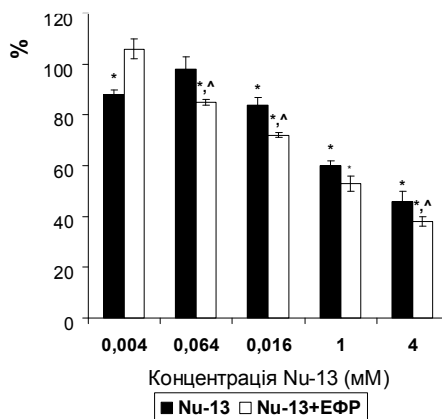


Рис. 2. Цитотоксичний/цитостатичний скринінг Nu-13 в діапазоні концентрацій (0,004-4мМ), застосованого самостійно та у комбінації з ЕФР (5 нМ), по відношенню до клітин MCF-7

* – $P < 0.05$, порівняно з контролем, [^] – $P < 0.05$, порівняно з Nu-13

При визначенні розподілу клітин за фазами циклу, 60% яких в контролі перебували в G_0/G_1 фазі (табл.1) було показано, що тест-агенти по-різному впливали на ці показники.

Таблиця 1. Розподіл клітин MCF-7 згідно фаз клітинного циклу за впливу НТМ, Nu-13, ЕФР, застосованих самостійно та у поєднанні

Тест-зразки	G_0/G_1 , %	S, %	G_2/M , %
Контроль	$58,8 \pm 2,1$	$32,6 \pm 1,3$	$8,4 \pm 1,6$
ЕФР	$38,9 \pm 0,9^*$	$46,9 \pm 1,4^*$	$14,0 \pm 1,9$
НТМ (1,5 мкг/мл)	$73,4 \pm 1,4^*$	$25,3 \pm 3,1$	$3,0 \pm 0,3^*$
НТМ (1,5 мкг/мл)+ЕФР(5нМ)	$78,3 \pm 2,2^{*^{\wedge}}$	$20,4 \pm 1,3^*$	$3,9 \pm 1,3^*$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5}$ М)	$62,2 \pm 0,9$	$34,9 \pm 3,6$	$2,9 \pm 0,4^*$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5}$ М)+ЕФР (5 нМ)	$49,0 \pm 3,7^{*^{\wedge}}$	$41,5 \pm 0,1^{*^{\wedge}}$	$9,5 \pm 2,2$

* – $P < 0.05$, порівняно з контролем; [^] – $P < 0.05$, порівняно з НТМ та Nu-13, застосованих самостійно

Як свідчать отримані дані, НТМ мав цитостатичний, цитотоксичний та проапоптичний вплив (табл.1 табл.2). Так, при додаванні до культивованих клітин НТМ, відносна кількість клітин у фазах G_0/G_1 зростала в 1,2 рази ($P<0.05$), порівняно з контролем, відсоток апоптичних клітин зростав в 4 рази ($P<0.01$), а мертвих клітин майже в 2 рази ($P<0.05$). Попередня інкубація клітин з ЕФР (5 нМ) 0,5 години перед додаванням НТМ характеризувалась збільшення відносного вмісту клітин в G_0/G_1 фазі до $78,3 \pm 2,2\%$, проти $73,4 \pm 1,4\%$ за впливу НТМ, $58,8 \pm 2,1\%$ в контролі та $38,9 \pm 0,9\%$ за впливу ЕФР.

Відбувся також перерозподіл в концентрації апоптичних та мертвих клітин – зменшення відсотку апоптичних, порівняно з впливом самого лише НТМ та збільшення мертвих, відповідно.

За впливу Nu-13 відсоток клітин в G_0/G_1 майже не відрізнявся від такого у контролі, тоді як за впливу Nu-13+ЕФР можна було спостерігати збільшення популяції клітин проліферативного пулу, як в порівнянні з контролем, так і з Nu-13 (табл.1). Проте, виявлено збільшення відносної кількості апоптичних клітин, як порівняно з контролем, так і за дії Nu-13 (табл.2)

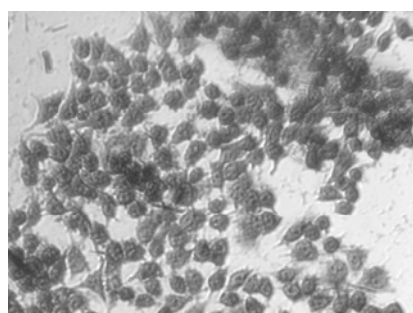
Таблиця 2. Відсоток апоптичних та мертвих клітин MCF-7 за впливу НТМ, Nu-13, ЕФР, застосованих самостійно та у поєднанні

Тест-зразки	Вміст апоптичних клітин, %	Вміст мертвих клітин, %
Контроль	$6,4 \pm 1,1$	$9,3 \pm 1,8$
ЕФР	$2,1 \pm 0,2^*$	$0,5 \pm 0,0^*$
НТМ (1,5 мкг/мл)	$24,5 \pm 0,3^*$	$17,4 \pm 3,5^*$
НТМ (1,5 мкг/мл)+ЕФР(5нМ)	$11,3 \pm 0,9^* \wedge$	$34,6 \pm 2,2^* \wedge$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5} M$)	$13,5 \pm 2,8^*$	$14,4 \pm 0,3^*$
Nu-13 ($1,6 \times 10^{-5} M$)+ЕФР (5 нМ)	$19,4 \pm 0,7^* \wedge$	$16,7 \pm 2,1^*$

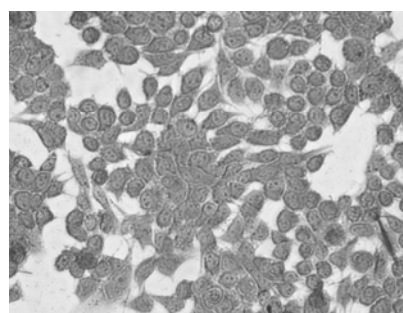
* $\wedge$ – $P<0.05$, порівняно з контролем та одноосібним використанням тест-зразка

При визначенні морфологічних особливостей та формування локусів адгезії за дії всіх досліджуваних тест-зразків клітини після відмивки фізіологічними буферами профарбовували фіолетовим кристалічним, як описано [18]. Як видно із фото (рис.3.), за впливу НТМ

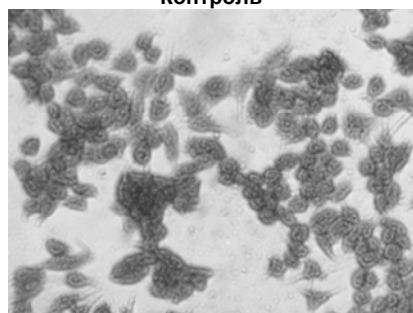
самостійно та в поєднанні з ЕФР спостерігалось скупчення клітин, з формуваннями в окремих зонах аналогів багатоклітинних сфероїдів, тоді як під впливом Nu-13 та Nu-13+ЕФР клітини набували еліпсоїдної фіорми з видовженими відростками.



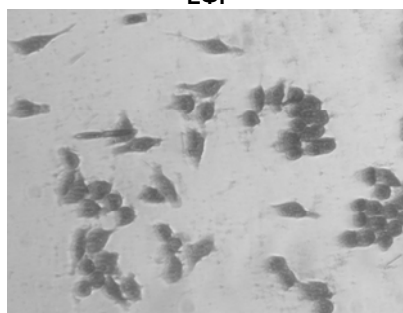
Контроль



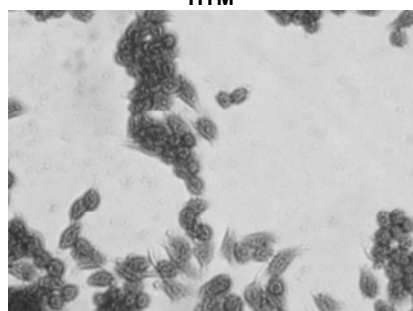
ЕФР



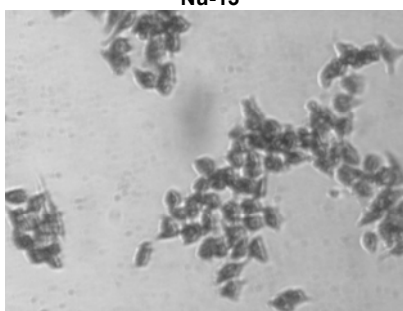
НТМ



Nu-13



НТМ+ЕФР



Nu-13+ЕФР

Рис.3. Морфологічні особливості прикріплених до субстрату клітин за дії ЕФР, НТМ, Nu-13, застосованих самостійно та в поєднанні; забарвлення фіолетовим кристалічним; x320

Отже, проведене дослідження з використанням культивованих пухлинних клітин MCF-7 з високим рівнем експресії РЕФР показало, що цитотоксичний/цитостатичний ефект за спільної дії специфічного ліганду до РЕФР у поєднанні з препаратом таргетної дії, направленої на РЕФР зростає. Поєднання впливу ЕФР та глікозидного аналогу 6-азацитидину Nu-13 характеризувалося збільшенням відносного вмісту апоптичних клітин, як порівняно з контролем, так і за впливу одного лише Nu-13. Визначення механізмів комбінованого впливу ЕФР із НТМ та Nu-13 потребують подальших досліджень.

Висновок:

Таким чином, застосування гуманізованих антитіл (німотузумаба) до рецептора ЕФР 1 типу в комбінації з ЕФР може розглядатися як ефективна антипроліферативна комбінація по відношенню до пухлинних клітин з експресією рецепторів ЕФР. Щодо Nu-13, то за сумісної дії з ЕФР виявлено збільшення відносного вмісту апоптичних клітин.

Список використаних джерел

- Boyd M Status of NCI. Preclinical antitumor drug discovery screen. // Principles and practice of oncology. – 1989. – v.3, N10. – P.1-12.
- Vacchelli E et al. Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncimmunology*. 2014 Jan 1;3(1):e27048. PMID 24605265.
- Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. – 2002. – Т.3, №4 – с.229-237.
- Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.42, с3-52.
- Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova J Let all Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // *PLoS One*. – 2008. – Т. 18. – P234-287.
- Knowlden J.M., Hutcheson I.R., Jones H.E., et al. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an

autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. // *Endocrinology*. – 2003. – Vol.144, No.3. – P.1032-44.

7. Riese D.J., Stern D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. // *Bioessays*. – 1998. – Vol.20. – P.41-8.

8. Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PM, Storm G, Schifferle RM. Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(6):605-17.

9. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:505-16.

10. R.Melarkode.An. Eswaraiiah, T. Crombet, et all. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal antibody for treatment of tumors of epithelial origin. // *MAbs* 2009,1 (1): 41-48. PMID 20046573.

11. Biswas DK1, Cruz AP, Gansberger E, Pardee AB. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – 97(15). – 8542-7.

12. Mateo C, Moreno E, Amour K, Lombardero J, Harris W, Pérez R. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: Recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 1997;3:71-81 PMID 9154469.

13. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Posypanova G.A., et all In vivo antitumor activity of cytotoxic drugs conjugated with human α -fetoprotein. // *Tumor Targeting*. – 1996. – Vol. 2. – P. 299-306.

14. Пальчиковська Л.Г., Гарманчук Л.В., Алексеева І.В., та ін. N1-глікозидні аналоги 6-азацитидину. II. Цитотоксична дія та вплив на транскрипцію in vitro. *Біополімери і клітина*, 2005, 21, №5, 432-438.

15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J Immunol Methods*. – 1983. – 65, N 1-2. – P. 55-63.

16. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A. Hursey M.L., Czerwinsky M.J, Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay // *Cancer Research*. – 1988. – 48. – P.589-601.

17. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *J. Immunol. Methods* 1991;139(2):271-280.

18. Л.В.Гарманчук, О.М.Перепелицина, І.І.Гринюк, та ін. Вплив фулеренів C60 на адгезивні властивості клітин раку молочної залози // *Доповіді національної академії наук України*, 2009, №4. – с. 164-167.

Надійшла до редколегії 08.07.14

Л. Гарманчук, д-р биол. наук.

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА УСИЛИВАЕТ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ / ЦИТОСТАТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ НИМОТУЗУМАБУ И ПРОАПОПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ β -D-КСИЛОФУРАНОЗИДУ НА КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Оценена ефективність комбінованого впливу на опухолеві клітини раку молочної залози лінії MCF-7 антитіл к рецептору епідермального фактора росту – німотузумабу, синтетического соединения – β -D-ксилофуранозиду (Nu-13 глікозидну аналог 6-азацитидину) в соєднанні з мітогеном епідермальним фактором росту. Показано, що ЕФР посилює цитотоксическое / цитостатическое действие німотузумабу і проапоптичну Nu-13.

Ключевые слова: опухолевые клетки, рак молочной железы, эпидермальный фактор роста.

L. Garmanchuk, DSc

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

EGF INCREASES CYTOTOXIC/CYTOSTATIC EFFECT OF NIMOTUZUMAB AND PROAPOPTOTIC ACTION OF 6-AZACYTOSINE β -D-XYLOFURANOSIDE TO CELLS OF BREAST ADENOCARCINOMA (MCF-7)

The efficiency of the combined effects on tumor cells of breast cancer MCF-7 antibodies to epidermal growth factor receptor – nimotuzumab, synthetic compounds – β -D-xylofuranoside (Nu-13, glycoside analogue 6 azacytosine) in combination with epidermal growth factor. Shown that EGF enhances the cytotoxic / cytostatic effect nimotuzumabu and proapoptotic action Nu-13.

Keywords: tumor cells, breast cancer, epidermal growth factor.