616-006: 615: 578.245: 613.632

Ю. Й. Кудрявець[1], д.б.н.,
Н. О. Бездєнєжних[1], М. Л. Марченко[2]

ПІДВИЩЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ДО ЦИТОТОКСИЧНИХ ЧИННИКІВ В УМОВАХ ПРОЛОНГОВАНОЇ ДІЇ ІНТЕРФЕРОНУ *IN VITRO*

[1] *Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, м. Київ*
[2] *Інститут медицини праці АМН України, м. Київ*

Інтерферони (ІФН), як відомо, належать до одних з найважливіших регуляторів реактивності організму людини на клітинному і системному рівні. Їх відносять до протизапальних й імунорегулюючих цитокінів. Особливу увагу привертають протипухлинні властивості ІФН, механізми яких до кінця ще не розкриті і на даний момент інтенсивно вивчаються [1]. Протипухлинна активність ІФН реалізується перш за все прямою дією на пухлинні клітини шляхом модифікації фенотипу, інгібіції експресії онкогенів і продукції ангіогенних факторів, шляхом його антипроліферативної дії. Він також підвищує активність неспецифічної і специфічної ланки імунного протипухлинного захисту організму: моноцитів, природніх кілерів, дендритних клітин і цитотоксичних Т-лімфоцитів. Інтерферон, як цитокін з широким спектром регуляторних функцій, виступає і як індуктор чи модифікатор апоптозу. Показано, що ІФН стимулює апоптоз, індукований різними чинниками [2]. Можливо, саме це призводить до підвищення чутливості клітин-мішеней до дії багатьох протипухлинних цитостатиків, однак ці факти отримані за умов короткострокової обробки клітин ІФН (до 96 год), а наслідки тривалої дії ІФН на пухлинні клітини залишаються невідомими. До цього часу не відомі також механізми посилення чутливості клітин до цитотоксичних агентів при дії ІФН. В основі цього можуть лежати зміни експресії генів, пов'язаних з лікарською резистентністю, активності багатоцільових оксидаз, мембранних структур, тощо. Дуже важливе визначення наслідків саме довгострокової експозиції пухлинних клітин з ІФН, тому що цей цитокін широко використовується тривалими курсами в сучасній клінічній онкології, іноді протягом року: при раку нирки, сечового міхура, меланомі та мієломній хворобі, при хронічному мієлолейкозі [3].

Великі надії на інтерферонотерапію покладають і при лікуванні хворих на недрібноклітинний рак легені людини (НДРЛ), оскільки на сьогодні їх лікування одна з найбільш складних проблем клінічної онкології внаслідок низької чутливості НДРЛ до консервативних (медикаментозному та променевому) методів лікування [4]. В останні 20 років розроблена велика кількість оптимальних схем хіміотерапії (ХТ) хворих на НДРЛ й постійно пропонуються нові. Найбільш активні комбінації протипухлинних препаратів містять циклофосфан, циклофосфамід, адріаміцин, цисплатин, вінкристин, метотрексат, а також етопозид. В 90-і роки XX сторіччя в практику ввійшов ряд нових цитостатиків, що мають протипухлинну активність при НДРЛ: таксани (таксол або паклітаксел, таксотер або доцетаксел), гемцитабін (гемзар), інгібітори топоізомерази І: топотекан (гикамтин) і іринотекан (кампто).

При лікуванні хворих онкологічного профілю за допомогою хіміотерапії, як відомо, виникає проблема лікарської резистентності, що пов'язана з продуктами таких генів, як MDR1 (АТФ-залежний глікопротеїн Pgp 170, який призводить до підсилення виведення з клітин ряду цитостатиків шляхом активного їх викиду); крім того, в клітинах існує система глутатіона, яка дозволяє знешкодити цитостатики. Хімічні взаємодії між глутатіоном та алкілуючими сполуками каталізуються групою ферментів глутатіон-S-трансфераз, різні ізоформи яких, вірогідно, взаємодіють з різними препаратами, підвищуючи ступінь детоксикації ліків. Таким чином, активація цих ферментів може визначати резистентність клітин до хіміопрепаратів.

У поєднанні з хіміотерапією та променевою терапією (ПТ) в онкологічних клініках застосовують гіпертермію (ГТ). При цьому виникають порушення репарації ДНК, денатурація білків, індукція білків теплового шоку, а також індукція апоптозу та інгібіція ангіогенезу [5]. Крім підвищення ефективності ХТ, у поєднанні з ГТ відзначають зниження її токсичності.

Виходячи з вищесказаного та беручи до уваги той факт, що в клініці ІФН застосовують тривалий період, ми піддавали клітини раку легені людини А-549 довготривалій експозиції з ІФН та вивчили дію різних цитотоксичних чинників (хіміопрепарати, метали, гіпертермія) на модифіковані ІФН клітини, а також експресію генів, функціонування яких пов'язане з лікарською резистентністю.

Матеріали та методи дослідження

Досліджувані клітини А-549 (отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України) культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640 ("SIGMA", США), що містило 4 ммоль/л L-глютаміну, 10% ембріональної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37 °С. Заміну середовища і пересів клітин проводили за стандартною схемою.

З метою вивчення модифікованих властивостей клітин їх культивували з ІФН *in vitro* довгостроково (до 1 року) в присутності цитокіну в зростаючих концентраціях (від 100 до 10000 од./мл) рекомбінантного інтерферону-альфа2b ("Біофарма", Україна).

Для порівняльного дослідження чутливості клітин А-549 та субліній модифікованих ІФН до хіміопрепаратів суспензію клітин вносили на 96-лункові планшети в концентрації $5x10^3$-$1x10^4$ клітин/лунку в 100 мкл повного поживного середовища. Через 24 год вносили досліджувані препарати: фарморубіцин швидкорозчинний (Пфайзер, Італія); метотрексат "Ебеве"(Австрія); елоксатин (Санофи, Франція); фтор-урацил (Україна), таксолік (доцетаксел) ("Біолек", Харків). Клітини інкубували при 37 ºС з препаратами протягом 48-72 год, після чого визначали рівень цитотоксичності шляхом фарбування клітин тетразолієм та/або барвником Sulforodamine B за стандартними методиками [6].

В дослідах використовували солі важких металів: $MnSO_4 \cdot H_2O$ (масова доля основної речовини — 98,18%), $HgCl_2$ (масова доля основної речовини — 99,6%) були отримані в "Хімлабореактив".

За допомогою імуноцитохімічного методу досліджували експресію білків, пов'язаних з лікарською резистентністю — Pgp та GST. Досліджувані клітини вирощували на покривних скельцях на протязі 24 год, фіксували в 4% розчині параформальдегіду протягом 20 хв, витримували з протеїназою К 3-4 хв та інкубували з 1% розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) 20 хв. Потім наносили моноклональні антитіла (МКАТ) (DakoCytomation, Данія) на 60 хв, після чого застосовували систему візуалізації EnVision (DakoCytomation, Данія), кон'юговану з пероксидазою. Через 45 хв виявляли активність ферменту за допомогою модифікованого методу Graham, Karnovsky [12] із застосуванням в якості субстрату ДАБ (диаминобензидин). Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували гематоксилін-еозином (10-15 с), після чого їх заключали в Faramount Aqueous Mounting Medium (DakoCytomation, Данія).

При дослідженні впливу гіпертермії на клітини різних етапів модифікації ІФН суспензії клітин прогрівали при 45 ºС протягом 1 години в повному живильному середовищі RPMI 1640, після чого їх культивували 24-72 год в стандартних умовах. Після культивування живі та мертві клітини підраховували в гемоцитометрі за допомогою барвника трипанового синього.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Клітини А-549 внаслідок довгострокового культивування з ІФН набували резистентності до антипроліферативної дії цитокіну. Так при дозі 2 тис МО/мл ріст контрольних клітин гальмувався на 50%, клітини ж, які культивувались з ІФН тривалий період, були не чутливі навіть до 10 тис МО/мл цитокіну.

Дослідження впливу довготривалої експозиції клітин А-549 з ІФН *in vitro* на їх чутливість до хіміопрепаратів показали, що модифіковані цитокіном клітини стали достовірно більш чутливими до дії цитостатиків в порівнянні з контрольними клітинами А-549. При цьому чутливість клітин підвищується до всіх хіміопрепаратів, незалежно від механізму їх дії (рис. 1-7). Так, модифіковані ІФН клітини стають більш чутливими (рис. 3, 4) до препаратів антрациклінового ряду (фарморубіцин) до 40% (рис. 1), таксолікам (рис. 2) та до антиметаболітів до 20% (фторурацил, метотрексат) (рис. 3, 4). При вивчені дії препаратів платини та ірінотекану суттєву різницю в чутливості виявляли лише в великих концентраціях (рис. 5, 6). При цьому клітини А-549 як контрольні, так і модифіковані ІФН, виявились малочутливими до даних препаратів. Отримані результати підтверджуються клінічними даними про недоцільність застосування цих препаратів в монотерапії онкологічних хворих [7]. Суттєвої різниці між клітинами різного ступеню модифікації не виявлено, тобто для підвищення чутливості клітин до цитотоксичних чинників, зокрема протипухлинних препаратів, достатньо вже 2 тис. МО/мл ІФН. Отримані дані свідчать про можливість суттєвих змін в пухлинних клітинах внаслідок довгострокової дії ІФН, в результаті чого клітини стають більш чутливими до протипухлинних препаратів.

Ми також виявили факт, який стосується проблеми лікарської резистентності в онкології. Клітини А-549 в процесі довгострокової експозиції з ІФН набували резистентності до його антипроліферативної дії, при цьому, як з'ясувалось, вони стали більш чутливими до дії протипухлинних препаратів. В зв'язку з цим виникає питання щодо стану в таких клітинах системи, пов'язаної з лікарською резистентністю. Ми за допомогою імуноцитохімічного методу дослідили експресію двох білків, підвищена кількість яких обумовлює нечутливість клітин до деяких протипухлинних препаратів, а саме Pgp та GST. При цьому виявили, що експресія даних білків суттєво знижується по мірі збільшення терміну інкубації клітин з ІФН і дози цитокіну (рис. 9, 10), що підтверджує їх більшу чутливість до протипухлинних агентів.

Таким чином, інтерферон здатен змінювати чутливість пухлинних клітин до ксенобіотиків. Раціонально було також порівняти чутливість клітин раку легені людини лінії А-549, модифікованих тривалою обробкою ІФН до дії солей важких металів, з такою клітин вихідної лінії. Механізми дії солей металів на пухлинні клітини суттєво відрізняються від впливу хіміопрепаратів: для багатьох важких металів (Cd^{2+}, Hg^{2+} та ін.) перший механізм їх цитотоксичності - порушення функцій мітохондрій [8]. У тому випадку, коли ці речовини потрапляють в організм per os, у кислому середовищі шлунку вони перетворюються у стійкі окислені форми та включаються у біологічно активні молекули організму. Це можуть бути протеїни та ензими, з якими вони формують стійкі зв`язки. Відбувається реакція заміщення водню металом у сульфгідрильних групах (-SH) цистеїну або сульфуру ($-SCH_3$) в молекулі метіоніну. Внаслідок цього атоми водню або металу, які в нормі є елементами ензиму чи білку, заміщуються отруйним металом, що виключає надалі їх нормальне функціонування [9]. Хоча механізми, що призводять до загибелі клітин, різні при дії металів та хіміопрепаратів, але кінцевий етап однаковий — каспазний шлях та апоптична загибель.

В данній роботі виявили, що модифікація клітин цитокіном призводить до значного підвищення їх чутливості і до деяких солей металів. Так цитотоксичність хлориду ртуті на клітинах А-549, модифікованих дією ІФН, зростає удвічі - IC_{50} хлориду ртуті в цих клітинах складає

0,01 мг/мл, тоді як у контрольних - 0,02 мг/мл. При концентрації чинника 0,015 мг/мл виживають практично 100% контрольних клітин, в той час як всі клітини, модифіковані ІФН, гинуть (рис. 7). При дослідженні впливу сульфату марганцю такої суттєвої різниці не виявлено, але тенденція підвищення чутливості клітин під дією ІФН, характерна для хлориду ртуті, зберігається (рис. 8). Механізм підвищеної чутливості модифікованих ІФН клітин до деяких солей ще нез'ясований. Він може залежати від особливостей плазматичної мембрани і проліферативного статусу цих клітин, в характері експресії каспази 3 та у статусі їх металотіонеїнів. В цілому, отримані результати підтвердили вже відомі дані щодо підвищення чутливості пухлинних клітин до апоптичних чинників різної природи при довгостроковій їх експозиції з ІФН. Цей факт потребує подальшого дослідження у зв'язку з можливим використанням нанокомпозитів важких металів у комплексній терапії пухлин з включенням ІФН.

Крім протипухлинних препаратів з різними механізмами дії та солей металів ми дослідили вплив гіпертермії на контрольні та модифіковані ІФН *in vitro* клітини А-549. Ця інформація є важливою у зв'язку з тим, що гіпертермія застосовується при терапії багатьох онкологічних захворювань. Відомі дані щодо ефективності комплексного застосування поліхіміотерапії (ПХТ), гіпертермії та інтерферонотерапії [4]. Разом з тим, механізми, що лежать в основі ефективності такої комбінованої терапії, не досліджені. В даній роботі ми дослідили вплив підвищеної (45 °С) температури на клітини А-549, модифіковані ІФН в різних концентраціях. Встановлено, що при модифікації клітин цитокіном їх стійкість до гіпертермії стрімко падає. Так, при дії підвищеної температури життєздатність зберігається у 70% контрольних клітин та лише у 40% клітин, що культивувались з 2 тис. МО/мл ІФН. При зростанні концентрації ІФН до 10 тис. МО/мл гинуть майже всі клітини (рис. 11). Морфологічні дослідження показали, що причиною їх загибелі є саме апоптоз.

Можна зробити висновки, по-перше, щодо суттєвих змін власти-

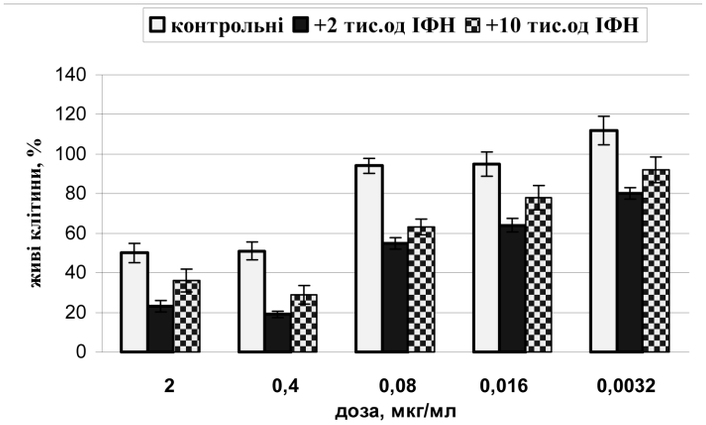

Рис. 1. Кількість живих клітин при дії фарморубіцину

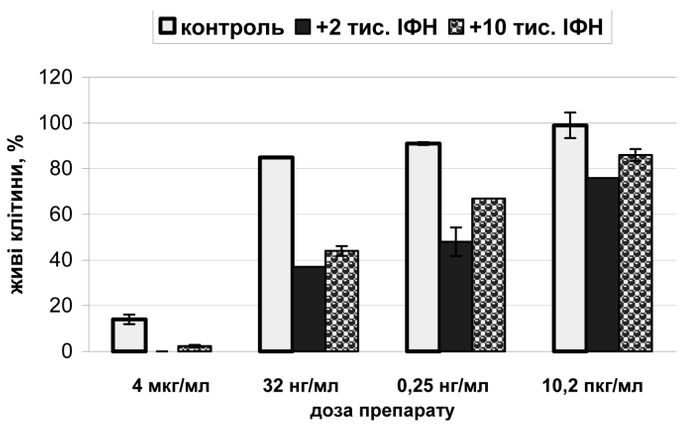

Рис. 2. Кількість живих клітин при дії доцетакселу

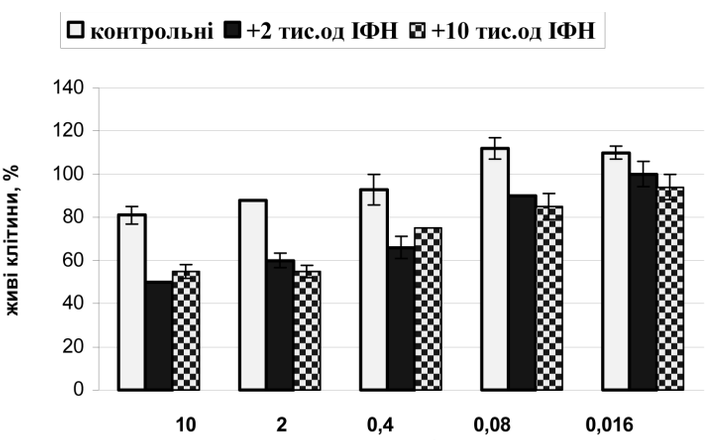

Рис. 3. Кількість живих клітин при дії фторурацилу

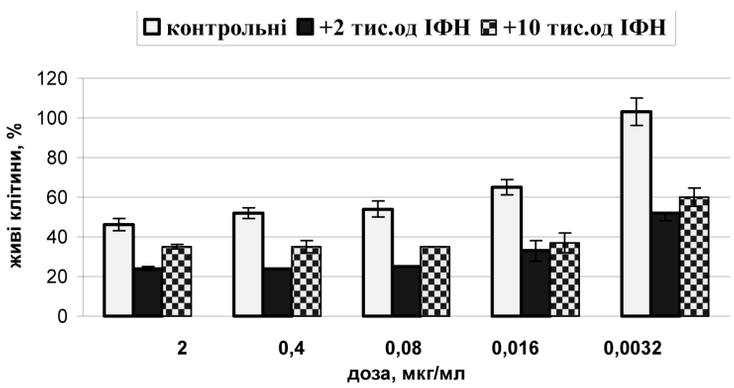

Рис. 4. Кількість живих клітин при дії метотрексату

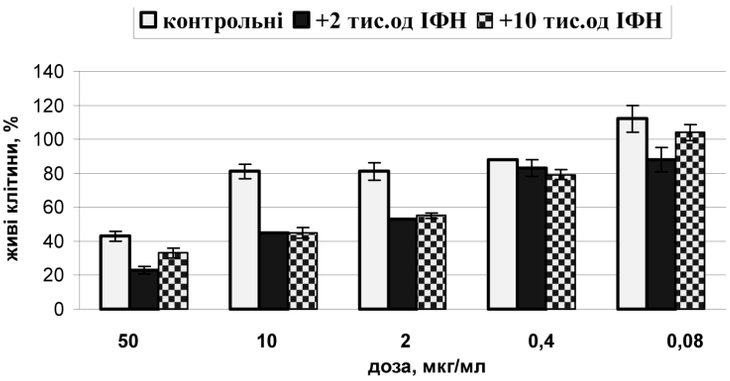

Рис. 5. Кількість живих клітин при дії елоксатину

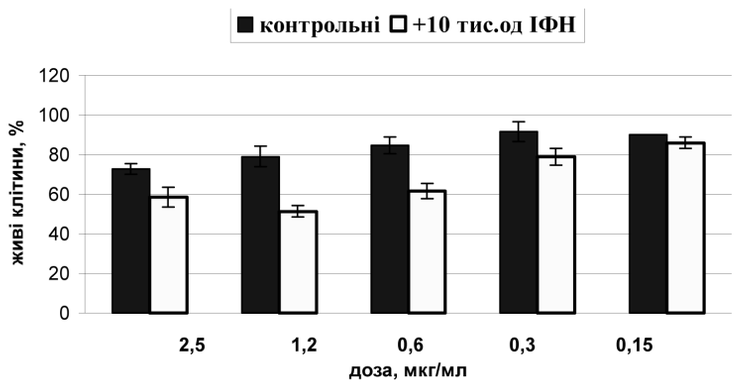

Рис. 6. Кількість живих клітин при дії ірінотекану

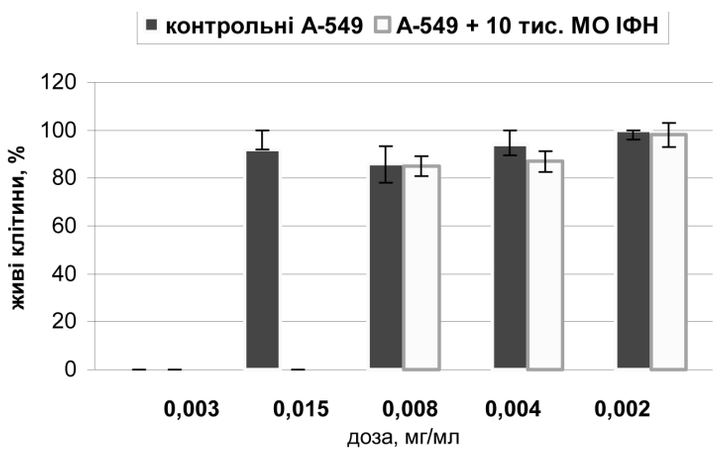

Рис. 7. Вплив $HgCL_2$ на клітини раку легенів людини А-549 контрольні та модифіковані інтерфероном

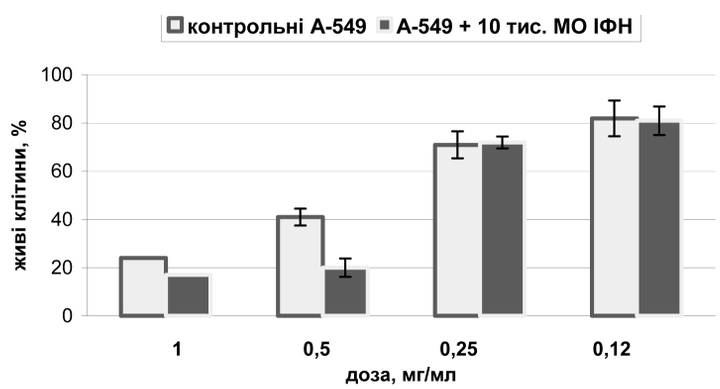

Рис. 8. Вплив $MnSO_4$ на клітини раку легенів людини А-549 контрольні та модифіковані інтерфероном

востей пухлинних клітин А-549 під впливом довгострокової дії ІФН *in vitro*. Та, по-друге, щодо появи моделі клітин з новими властивостями, набутими внаслідок довготривалого впливу на них ІФН, яка має значно більшу чутливість до цитотоксичних агентів різної природи.

Використані нами цитотоксичні чинники відрізняються механізмами токсичної дії — це вплив на ДНК клітин, мікротрубочки, плазматичну мембрану і т.п. Разом з тим, ІФН в усіх випадках, незалежно від механізму дії чинника, викликає в пухлинних клітинах стан більшої здатності до апоптозу.

На цей час відомо, що токсичний вплив на клітини ссавців, включаючи дію солей важких металів, супроводжується зміною експресії сотень генів. Кінцевим етапом дії цих чинників є активація сигнальних шляхів програмованої клітинної загибелі - апоптозу, в тому числі каспазним шляхом. ІФН, в свою чергу, викликає експресію десятків генів, перш за все p68 протеїнкінази та 2'-5'-оліго А синтетази, що забезпечують резистентність клітин по відношенню до вірусів і приймають участь в розвитку апоптичної загибелі клітин. Завершуючим етапом проапоптичної дії ІФН також є каспазний шлях. Все це свідчить, що серед безлічі можливих механізмів посилення ІФН чутливості клітин до цитотоксичного впливу основним кінцевим етапом є каспазний шлях. Однак, наші попередні дані показали, що для ІФН-модифікованих клітин дійсно характерним є високий, відносно контрольних клітин, базальний рівень каспази-3. Можливо, що саме ця особливість ІФН-модифікованих клітин робить їх більш чутливими та підвищує у них процент апоптозу. Важливою обставиною є те, що стан більшої схильності до апоптозу зберігається в ІФН-модифікованих клітин і у відсутності самого цитокіну. Наявність суттєвих цитогенетичних змін в ІФН-модифікованій сублінії свідчить, що тривала дія ІФН супроводжується не тільки значними фенотиповими змінами в експресії маркерів, асоційованих з лікарською резистентністю, але суттєвою клональною перебудовою у пухлинної популяції.

Такі характеристики клітин сублінії А-549-ІФН можуть бути використані для створення чутливої

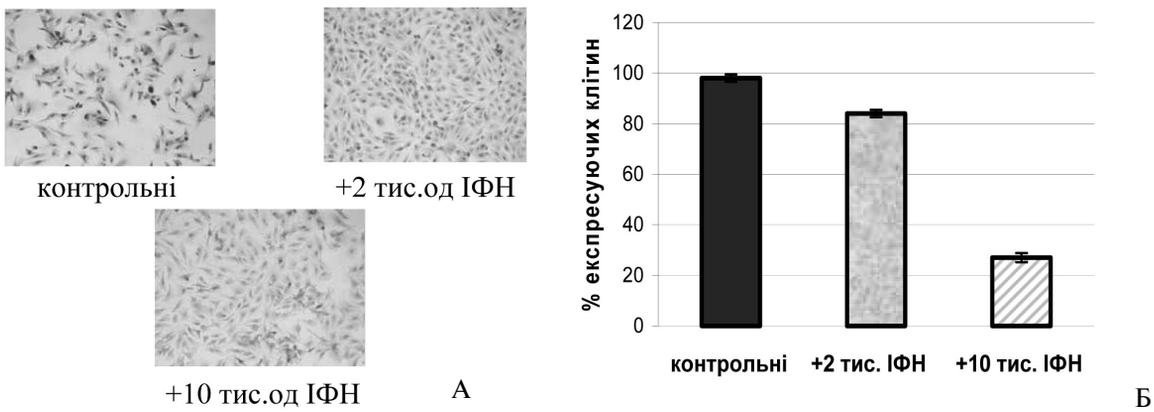

Рис. 9. Експресія Pgp в клітинах А-549 в умовах тривалої експозиції клітин з інтерфероном: А. Імуноцитохімічні препарати (об'єктив – х20); Б. Клітини з позитивною експресією

моделі при тестуванні ксенобіотиків та інших факторів можливого впливу на організм. Особливої уваги заслуговує логічне питання про можливість зростання вразливості нормальних клітин організму при дії цитотоксичних чинників після пролонгованої експозиції ІФН. Хронічний вплив ІФН на організм ще потребує багатьох досліджень, однак нетривала дія ІФН на нормальні клітини крові і кісткового мозку (фтор-урацил, гіпертермія) супроводжується розвитком захисної реакції у відповідь на цитотоксичне подразнення [10]. Така захисна дія ІФН сприяла вибірковій елімінації пухлинних клітин в умовах гіпертермії клітин кісткового мозку у хворих на лейкемію [11].

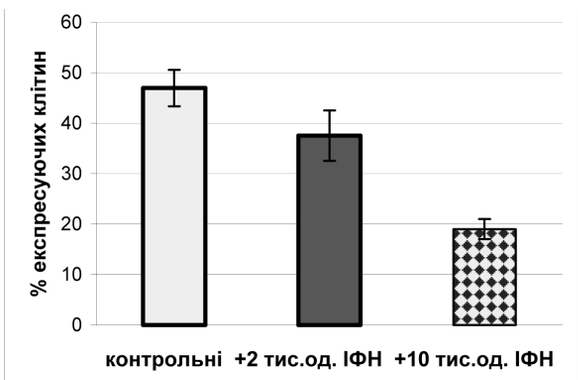

Рис. 10. Експресія GST в клітинах А-549 в умовах тривалої експозиції клітин з інтерфероном

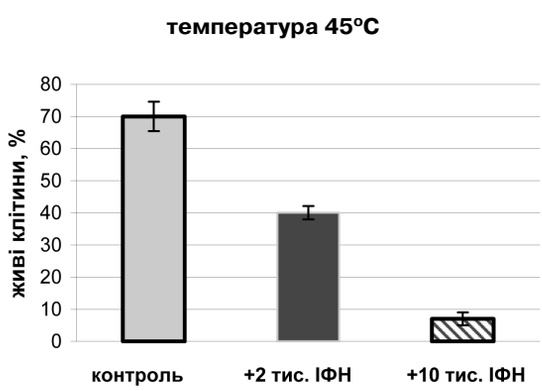

Рис. 11. Вплив гіпертермії на клітини А-549 в умовах пролонгованої дії ІФН

Висновки:

1. Модифіковані ІФН клітини стають більш чутливими до всіх досліджених протипухлинних антибіотиків та антиметаболітів.
2. При тривалій модифікації клітин А-549 ІФН виявляється суттєве зниження кількості таких, що експресують білки, пов'язані з лікарською резистентністю, а саме Pgp та GST.
3. Модифікація пухлинних клітин тривалою експозицією з ІФН здатна підвищувати їх чутливість до хлориду ртуті.
4. Модифіковані ІФН пухлинні клітини стають суттєво чутливішими до гіпертермічних впливів.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова А. Л., Кудрявец Ю. И. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных// Онкология. — 2000. — № 2. — С. 16-24.
2. Кудрявець Ю. Й. Інтерферон-альфа посилює розвиток апоптозу, індукованого різними чинниками в пухлинних клітинах in vitro// Експериментальна онкологія. — 2001. — № 4. — С. 267-273.
3. Воронцова А. Л., Кудрявец Ю. И., Жильчук В. Е. Интерфероны и их применение в клинической онкологии // Здоровье женщин. — 2003. — № 4. — С. 8-13.
4. Hansen H. H., Bunn P. A. Lung cancer therapy. — New York: Taylor&Francis, 2005. — P. 65-105.
5. Шевченко А. І., Ганул В. Л., Ганул А. В., Осинський Д. С. Гіпертермія в онкології: досягнення та оригінальні методики// Онкологія. — 2006. — Т. 8, № 3. — С. 222 — 227.
6. Марченко М. Л., Бездєнєжних Н. О., Кудрявець Ю. Й. Порівняльна характеристика цитотоксичного впливу сполук важких металів на клітини людини, культивовані in vitro// Укр.журн.з проблем медицини праці. — 2008. — Т. 3, № 15. — С. 27-32.
7. Арсеньев А. И. Адъювантная химио-

терапия и лучевая терапия операбельного немелкоклеточного рака легкого // Практическая онкология. — 2006. — Т. 7, № 3. — С. 154 — 160.
8. Belyaeva E. A. et al. Cd^{2+}-promoted mitochondrial permeability transition: a comparison with other heavy metals// Acta Biochimica Polonica. — 2004. — V. 51, № 2. — P. 545-551.
9. Duruible J. O., Ogwuegbu M. O. C., Egwurugwu J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects// Internat. J. of Physical Sciences. — 2007. — V. 2, № 5. — P. 233 — 307
10. De Filippi R., Prete S., Giuliani A. et al. Differential effect of recombinant interferon-alpha and 5-fluorouracil against colon cancer cells or against peripheral blood mononuclear cells // Anticancer Res. — 1994. — V. 14, № 5. — P. 1767 — 1774.
11. Osman Y., Moriyama Y., Shibata A. Enhanced elimination of Ph+chromosome cells in vitro by combined hyperthermia and other drugs (AZT, IFN-alpha, TNF and quercetin): its application to autologous bone marrow transplantation for CML// Experim.Hematol. — 1995.-V. 23, № 5. — P. 444 — 452.
12. Graham R. C., Karnovsky M. J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique // J. Histochem. Cytochem. — 1966. — V. 14, №. 4. — P. 291.

Ю. И. Кудрявец, Н. А. Безденежных, М. Л. Марченко

ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ЦИТОТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ В УСЛОВИЯХ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ІНТЕРФЕРОНА *IN VITRO*

На клетки рака легкого человека действовали цитотоксическими факторами разной природы и изучали изменения, которые происходили в клетках в зависимости от степени их модификации интерфероном. Показано, что длительная экспозиция клеток с интерфероном дозозависимо вызывает фенотипические изменения, которые влияют на чувствительность клеток к исследуемым токсическим агентам (химиопрепараты, соли металлов, гипертермия), при этом повышение чувствительности существенно возрастает по мере приобретения клетками модифицированного фенотипа.

Y. I. Kudriavets, N. A. Bezdenezhnykh, M. L. Marchenko

INCREASE OF HUMAN TUMOUR CELLS SENSIBILITY TO CYTOTOXIC INFLUENCE IN THE CONDITIONS OF LONG-LASTING ACTION OF INTERFERON *IN VITRO*

With the purpose of assessment of long-term action of the interferon on the tumour cells sensitiveness to cytotoxic actions the proper model is created. In this model cells of pulmon cancer were modified by the long-lasting exposition by the cytokine. Cells were affected by the cytotoxic actions of the different origin. Changes which took place depending on the degree of cells modification by the interferon were studied. It was found that the long-lasting exposition by the interferon causes the dependence from dose phenotypic changes, which influence the sensitivity of cells to toxic agents, which was assessing (anticancer drugs, heavy metals salts & cells exposition in hyperthermic conditions). Sensitivity of cells is incrising as far as asquisition of modified phenotype.