

## Кудрявцев Ю.Й., Безденежных Н.О., Лихова О.О., Воронцова А.Л., Завелевич М.П., Фільченков О.О. МЕХАНІЗМИ МОДИФІКАЦІ ЧУТЛИВОСТІ КЛІТИН РАКУ ЛЕГЕНІ ЛЮДИНИ ДО ПРОТИПУХЛИННИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛО ЕКСПОЗИЦІ КЛІТИН З АЛЬФА-ІНТЕРФЕРОНОМ

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України,  
м. Київ

МЕХАНІЗМИ МОДИФІКАЦІ ЧУТЛИВОСТІ КЛІТИН РАКУ ЛЕГЕНІ ЛЮДИНИ ДО ПРОТИПУХЛИННИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛО ЕКСПОЗИЦІ КЛІТИН З АЛЬФА-ІНТЕРФЕРОНОМ – Довготермінова інкубація клітин A-549 при наявності ІФН підвищує чутливість клітин до цитотоксичних агентів різних за структурою та механізмом дії, а також до гіпертермії. Підвищення чутливості ІФН-модифікованих клітин до цитотоксичних агентів супроводжується зростанням в клітинах базального та індукованого рівня активно форми каспази-3, збільшенням експресії мРНК топоізомерази II альфа та зменшенням експресії антиапоптотичного білка Bcl-2, що свідчить про зменшення резистентності до індукції апоптозу в ІФН-модифікованих клітинах A-549.

МЕХАНІЗМИ МОДИФІКАЦІ ЧУТЛИВОСТІ КЛІТОК РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА К ПРОТИВОПУХОЛЕВИМ ХІМІОПРЕПАРАТАМ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЕКСПОЗИЦІИ С АЛЬФА-ІНТЕРФЕРОНОМ – Длительная инкубация клеток A-549 в присутствии ИФН повышает их чувствительность к цитотоксическим агентам различной структуры и механизма действия, а также к гипертермии. Повышение чувствительности ИФН-модифицированных клеток к цитотоксическим агентам сопровождается повышением базального и индуцированного уровня активной формы каспазы-3, повышением экспрессии мРНК топоизомеразы II альфа и снижением экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2. Все это свидетельствует об уменьшении резистентности к индукции апоптоза в ИФН-модифицированных клетках A-549.

MECHANISMS OF MODIFICATION OF SENSITIVITY OF HUMAN LUNG CANCER TO ANTICANCER CHEMOTHERAPEUTICS AT LONG EXPOSURE OF CELLS WITH ALPHA-INTERFERON – Long-term exposure of A-549 cell to IFN-alpha increases their sensitivity to the cytotoxic agents with various chemical structure which differ by their mechanisms of cytotoxicity. Such increase in the sensitivity to the cytotoxic agents is accompanied with the increase of baseline and induced levels of active form of caspase-3, elevated expression of topoisomerase II alpha mRNA and increase expression of antiapoptotic Bcl-2 protein suggesting the decreased resistance to apoptosis induction in A-549 cells modified by INF-alpha.

**Ключові слова:** альфа-інтерферон, недрібноклітинний рак легені людини, хіміотерапія, апоптоз, каспаза-3.

**Ключевые слова:** альфа-интерферон, немелкоклеточный рак легкого человека, химиотерапия, апоптоз, каспаза-3.

**Kew words:** interferon-alpha, non-small cell lung cancer, chemotherapy, apoptosis, caspase-3.

**ВСТУП** Відомо, що загибель пухлинних клітин під впливом хіміотерапевтичних агентів та фізичних чинників може відбуватись шляхом апоптозу або некрозу [1, 2]. Оскільки протипухлинна терапія має переважно бути спрямована на апоптотичну загибель пухлинних клітин, велика увага приділяється пошуку агентів, які можуть модифікувати чутливість пухлинних клітин до індукції апоптозу. Одним з таких факторів може бути альфа-інтерферон (ІФН). Зокрема показано, що ІФН здатен підсилювати апоптоз, індукований фактором некрозу пухлин [3]. Вивчення ролі ІФН у модифікації чутливості пухлинних клітин до цитотоксично дії хіміопрепаратів дозволить суттєво змінити підхід до існуючих схем використання ІФН в лікувальних комбінаціях, нових варіантах і протоколах антиметастатично терапії.

В дослідженнях ряду авторів було показано, що за умов короткотермінового впливу ІФН на пухлинні клітини *in vitro* зміни фенотипу не були довготривалими і за подальшого культивування без ІФН відновлювались вихідні властивості пухлинних клітин [4, 5]. Мета роботи полягала у дослідженні впливу тривалого (протягом року) впливу ІФН на чутливість клітин A-549 недрібноклітинного раку легені людини до протипухлинних хіміопрепаратів та до гіпертермії.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** Об'єктом досліджень були клітини A-549 недрібноклітинного раку легені людини (НДРЛ), отримані з Банку клітинних ліній ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького НАН України, які культивували в повному поживному середовищі RPMI 1640 ("Sigma Chem. Co.",

США), що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріонально сироватки теляти ("Sigma Chem. Co.") та 40 мкг/мл гентаміцину; клітини культивували у зволоженої атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С, заміну середовища проводили кожні 2 доби, пересів клітин – через 4 доби. В дослідженнях використовували рекомбінантний альфа-2b-ІФН ("Біофарма", Україна), а також протипухлинні препарати: фарморубіцин швидкодіючий ("Pfizer", Італія); метотрексат ("Ebewe Arzneimittel GmbH", Австрія); елоксатин ("Sanofi Winthrop Industria", Франція); флуорурацил ("Дарниця", Україна); таксолік (доцетаксел; "Біолік", Україна), іринотекан ("Pfizer", Італія), адриабластин ("Pharmacia&Upjohn", Італія).

Для порівняльного дослідження чутливості до хіміопрепаратів вихідних клітин A-549 та субліній, модифікованих ІФН, суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 5x10<sup>3</sup>-1x10<sup>4</sup> клітин/лунку. Через 24 год вносили досліджувані препарати. Клітини інкубували при 37 °С з препаратами протягом 72 год, після чого визначали рівень цитотоксичності шляхом фарбування клітин МТТ та/або Sulfurodamine В і розраховували IC<sub>50</sub> за стандартними методиками [6, 7].

При дослідженні впливу гіпертермії на клітини х прорівали при температурах 42-45 °С протягом 1 год в повному поживному середовищі, після чого культивували 24-72 год за стандартних умов. Після культивування клітини забарвлювали трипановим синім та підраховували в гемоцитометрі.

Рівень білка Bcl-2 в досліджуваних клітинах вивчали за допомогою імуноцитохімічного методу. Використовували МКАТ проти Bcl-2 (clone 124) фірми "DakoCytomation" (Данія) та систему EnVision ("DakoCytomation") для візуалізації.

Експресію в клітинах мРНК топоізомерази II-б визначали за методом ЗТ-ПЛР з використанням наборів "Рибо-золь-А" та "РЕВЕРТА-Л" ("Амплісенс", Росія). Для ампліфікації застосовували праймери: 5'-GGCTCGATTGTTATTTCCAC-3' та 5'-GGTTGTAAGAATTAAGAATAGC-3' [8].

Для виявлення активно форми каспази-3 в клітинах використовували проточний цитофлуориметр FACScan ("Becton Dickinson", США) та набір "mAb Apoptosis Kit FITC" ("BD Bioscience Pharmingen", США) згідно з інструкцією фірми-виробника.

Статистична обробка одержаних результатів проводилася за допомогою програми STATISTICA 6.0. Для порівняння вірогідності відмінностей середніх величин використовували *t*-критерій Стюдента; при цьому вірогідними вважали відмінності при P<0,05.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення пролонговано дії ІФН на пухлинні клітини х довгостроково (до року) культивували при наявності ІФН в зростаючих дозах (від 100 до 10000 МО/мл). Було отримано дві сублінії клітин, модифіковані ІФН, в дозах 2000 та 10000 МО/мл (A-549/2000 та A-549/10000, відповідно).

Результати визначення IC<sub>50</sub> у вихідній лінії A-549 та сублініях, модифікованих ІФН (таблиця), показали, що модифіковані ІФН клітини стали достовірно більш чутливими до дії цитостатиків. Виявилось, що чутливість клітин підвищувалася до всіх хіміопрепаратів, незалежно від механізму х дії, причому кратність зменшення IC<sub>50</sub> була приблизно однаковою, незалежно від вихідно чутливості до препаратів. Суттєво різниці між ефективністю різних доз ІФН щодо його здатності підвищувати чутливість клітин до цитостатиків не було; більше того, ефективне підвищення чутливості клітин до цитотоксичних чинників мало місце при довготерміновому культивуванні з ІФН вже в дозі 2000 МО/мл (табл. 1).

Таблиця 1. Чутливість клітин A-549 до хіміопрепаратів за умов тривало експозиції з ІФН

Хіміопрепарат	Лінія A-549	Сублінія A-549/2000	Сублінія A-549/10000
	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)		
Фарморубіцин	0,4	0,08	0,1
Метотрексат	0,08	0,003	0,005
Елоксатин	20	3	5
Флуорурацил	20	2	2
Таксолік	2	0,1	0,2
Іринотекан	20	5	5

При дослідженні гіпертермічного впливу на клітини A-549 встановлено, що чутливість до підвищеної температури клітин субліній A-549/2000 та A-549/10000 була значно більшою порівняно з вихідною лінією. Так, інкубування при температурі 42 °C з наступним культивуванням за стандартних умов призводило до загибелі близько 70 % клітин субліній A-549/10000, в той час як життєздатність клітин A-549 за такого ж впливу практично не змінювалася. Збільшення температури до 45 °C викликало загибель 30 % клітин у вихідній лінії, тоді як кількість виживших ІФН-модифікованих клітин за цих умов становило до 100 % залежно від терміну культивування з цитокином та дози ІФН. Морфологічні дослідження показали, що експозиція при підвищеній температурі клітин субліній A-549/2000 та A-549/10000 призводить до індукції апоптозу (рис. 1).

Оскільки культивування при наявності ІФН може змінювати фенотипові властивості клітин, становило певний інтерес визначити відмінності за деякими фенотиповими показниками між вихідною лінією A-549 та сублініями, отриманими за довготерміново ді ІФН.

За допомогою імуноцитохімічного методу з використанням МКАТ до Bcl-2 було виявлено різке зменшення

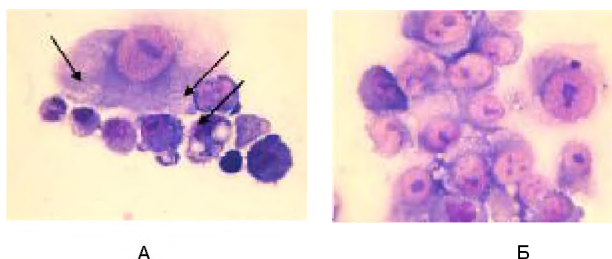


Рисунок 1. Цитоспінові препарати клітин A-549 після гіпертермії (1 год при 42 °C) з наступним культивуванням протягом 48 год за стандартних умов. Препарати пофарбовані за Романовським-Гімза. X 90.

Примітки: – А. клітини субліній A-549/10000 (стрілками вказані апоптотичні клітини та клітини з патологіями мітозу). Б. – клітини вихідної лінії A-549.

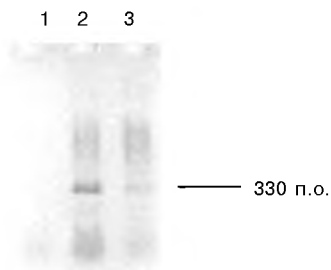


Рисунок 3. Експресія мРНК топоізомерази II альфа в клітинах A-549 за умов довготерміново експозиції з ІФН. Електрофорез фрагментів ДНК, ампліфікованих в ЗТ-ПЛР з праймерами до фрагменту гена топоізомерази II альфа.

Примітка: 1 – вихідна лінія A-549; 2 – сублінія A-549/10000; 3 – сублінія A-549/10000, яку в подальшому культивували в середовищі без ІФН.

відсотку Bcl-2-позитивних клітин в сублініях A-549/2000 та A-549/10000 (рис. 2).

Експресію топоізомерази II альфа у клітинах розглядають як маркер чутливості до інгібіторів топоізомерази II, а також маркер проліферації клітин [8, 9]. Порівняння експресії мРНК гена топоізомерази II альфа у вихідній лінії та в сублініях клітин A-549, що зазнали довготерміново ді ІФН, за допомогою напівкількісного методу ЗТ-ПЛР свідчить про суттєве збільшення експресії в клітинах A-549/10000 (рис. 3). Причому таке зростання експресії залишалось стабільним навіть в разі культивування цих клітин у середовищі, яке не містить ІФН. Можна припустити, що виявлене нами підвищення експресії гена топоізомерази II альфа в клітинах A-549 корелює з підвищеною чутливістю ІФН-модифікованих клітин до протипухлинних препаратів.

Ми провели порівняльний аналіз вмісту клітин з активною формою каспази-3 у вихідній лінії та субліній A-549/10000. Виявилось, що відсоток клітин з активною формою цієї ефекторної каспази є більш високим в модифікованій сублінії. Ці відмінності базального рівня корелювали також зі значно більшим рівнем активації каспази-3 в сублінії, модифікованій ІФН порівняно з такою у вихідній лінії A-549 за дії адриабластину (рис. 4).

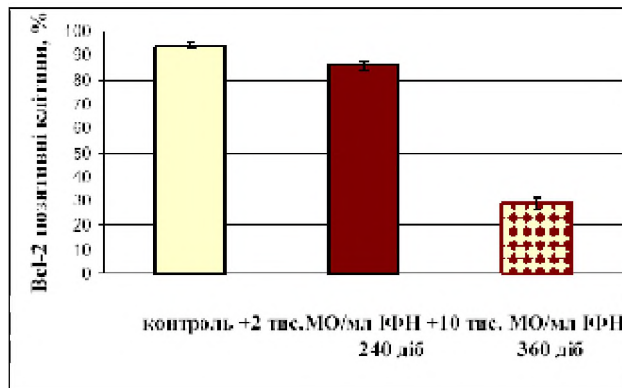


Рисунок 2. Рівень антиапоптотичного білка Bcl-2 в клітинах A-549 після довготерміново експозиції з ІФН.

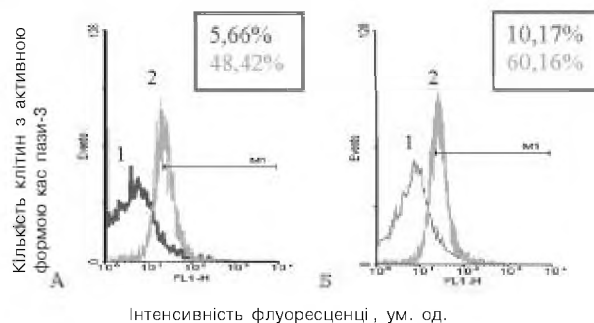


Рисунок 4. Активна форма каспази-3 (1 – базальний рівень; 2 – індукований адриабластином рівень) в клітинах вихідної лінії A-549 (А) та субліній A-549/10000 (Б). M1 – зона гістограми, яка відповідає вмісту клітин з активною формою каспази-3.

**ВИСНОВКИ** 1. У результаті довготривало інкубації клітин A-549 при наявності ІФН відбувається підвищення чутливості клітин до цитотоксичних агентів різних за структурою та механізмом дії. Підвищується також і чутливість ІФН-модифікованих клітин до гіпертермії.

2. Підвищення чутливості ІФН-модифікованих клітин до цитотоксичних агентів супроводжується зростанням в клітинах базального та індукованого рівня активно форми каспази-3, збільшенням експресії мРНК топоізомерази II альфа та зменшенням експресії антиапоптотичного білка Bcl-2, що свідчить про зменшення резистентності до індукції апоптозу в модифікованих ІФН клітинах A-549.

*Робота виконана при частковому фінансуванні на тему "Фундаментальні основи геноміки і протеоміки" (№ 107U002244), яка виконується в рамках цільової програми НАН України. Автори висловлюють подяку канд. біол. наук Н.М. Храновській за допомогу в аналізі даних цитометричних досліджень.*

ЛІТЕРАТУРА

1. Johnstone R.W., Ruefli A.A., Lowe S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy // Cell. – 2002. – Vol. 108, N 2. – P. 153-164.
2. Фільченков О.О., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: ТДМУ "Укрмедкнига", 2006. – 524 с.
3. Кудрявцев Ю.Й. Интерферон-б посилює розвиток апоптозу, індукованого різними чинниками в пухлинних клітинах in vitro // Експерим. онкол. – 2001. – Т. 4, № 23. – С. 267-273.
4. Jin G., Zhang T., Wang T. et al. Inhibition of alpha-interferon and cinnamic acid on proliferation of human lung cancer cell // Ai Zheing. – 2002. – Vol. 21, N 8. – P. 860-862.
5. Lypez Ocejjo O., Perea S.E., Reyes A., Vígola L., Lypez Saura P. Partial phenotypic reversion of HeLa cells by long-term interferon-alpha treatment // J. Interferon Res. – 1993. – Vol. 13, N 5. – P. 369-375.
6. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay // J. Immunol. Meth. – 1990. – Vol. 130, N 1. – P. 149-151.
7. Skehan P., Storeng R., Scudiero D. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening // J. Natl. Cancer Inst. – 1990. – Vol. 82, N 13. – P. 1107-1112.
8. Miracco C., Maellaro E., Pacenti L. et al. Evaluation of MDR1, LRP, MRP, and topoisomerase IIalpha gene mRNA transcripts before and after interferon-alpha, and correlation with the mRNA expression level of the telomerase subunits hTERT and TEP1 in five unselected human melanoma cell lines // Int. J. Oncol. – 2003. – Vol. 23, N 1. – P. 213-220.
9. Pritchard K.I., Messersmith H., Elavathil L. et al. HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 26, N 5. – P. 736-744.

УДК 616.33-006.6-089.166-089.819.8-085.28.

<sup>1</sup>Ярема Р.Р., <sup>1</sup>Фецич Т.Г., <sup>1</sup>Зубарев М.Г., <sup>2</sup>Огорчак М.А.

**ЗАСТОСУВАННЯ ІНТРАОПЕРАЦІЙНО ВНУТРІШНЬОЧЕРЕВНО ГІПЕРТЕРМІЧНО ХІМІОТЕРАПІ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКУВАННІ МІСЦЕВОПОШИРЕНОГО ТА ДИСЕМІНОВАНОГО РАКУ ШЛУНКА**

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

<sup>2</sup>Львівський державний онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр

ЗАСТОСУВАННЯ ІНТРАОПЕРАЦІЙНО ВНУТРІШНЬОЧЕРЕВНО ГІПЕРТЕРМІЧНО ХІМІОТЕРАПІ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКУВАННІ МІСЦЕВОПОШИРЕНОГО ТА ДИСЕМІНОВАНОГО РАКУ ШЛУНКА – Хворі на місцевопоширений рак шлунка з високим ризиком імплантацийного метастазування та хворі на карциноматоз очеревини на ґрунті раку шлунка мають несприятливий прогноз. Накопичений світовий досвід дозволяє розглядати комбінацію хірургічного лікування та інтраопераційно внутрішньочеревно гіпертермічно хіміотерапії (ІВЧГХ) як один з найперспективніших методів лікування хворих цієї категорії. В даній роботі наведено безпосередні результати комбінованого лікування 11 хворих на місцевопоширений та дисемінований рак шлунка з використанням ІВЧГХ. Застосування вказаного методу лікування свідчить про його ефективність, задовільну переносимість хворими, низький рівень післяопераційних ускладнень та летальності.

ПРИМЕНЕНИЕ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ВНУТРИБРЮШНОЙ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ХИМИОТЕРАПИИ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННОГО И ДИСЕМИНИРОВАННОГО РАКА ЖЕЛУДКА – Местнораспространенный рак желудка с высоким риском имплантационного метастазирования и рак желудка осложненный карциноматозом брюшины характеризуются неблагоприятным прогнозом. Накопленный мировой опыт позволяет рассматривать комбинацию хирургического лечения и интраоперационной внутрибрюшной гипертермической химиотерапии (ИВБГХ) как один из наиболее перспективных методов лечения больных этой категории. В работе приведены непосредственные результаты комбинированного лечения 11 больных с местнораспространенным и дисеминированным раком желудка с использованием ИВБГХ. Применение указанного метода лечения подтверждает его эффективность, удовлетворительную переносимость больными, низкий уровень послеоперационных осложнений и летальности.

APPLICATION OF INTRAOPERATIVE INTRAPERITONEAL HYPERTHERMIC CHEMOTHERAPY FOR COMBINED TREATMENT OF LOCAL-ADVANCED AND DISSEMINATED GASTRIC CANCER – The patients with local-advanced gastric cancer with high risk of intraperitoneal distribution and patients with gastric cancer complicated with peritoneal carcinomatosis have unfavourable prognosis. However, in selected patients, the natural history of this disease condition may be altered by using the multimodality approach of cytoreductive

surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. A population of 11 patients with local-advanced and disseminated gastric cancer treated by intraoperative intraperitoneal chemohyperthermic perfusion at a temperature of 41-44 °C. Encouraging results which require confirmation in prospective randomized studies were achieved.

**Ключові слова:** рак шлунка, карциноматоз очеревини, інтраопераційна внутрішньочеревна гіпертермічна хіміотерапія.

**Ключевые слова:** рак желудка, карциноматоз брюшины, интраоперационная внутрибрюшная гипертермическая химиотерапия.

**Key words:** gastric cancer, peritoneal carcinomatosis, intraoperative intraperitoneal hyperthermic chemotherapy.

**ВСТУП** Незважаючи на стійку тенденцію до зниження рівнів захворюваності, рак шлунка впевнено посідає друге місце в структурі онкологічно смертності, однак залишається складною медико-соціальною проблемою [1, 2]. Показник летальності до 1 року після встановлення діагнозу раку шлунка в Україні станом на 2007 рік склав 62,6 % [2]. Це пов'язано з тим, що 55,7-90 % хворих госпіталізують в лікувальні установи з місцевопоширеними та генералізованими формами пухлинного процесу, при цьому частка ІV стадії складає 30,9-57 % та не має тенденції до зниження [2, 3].

Імплантацийну дисемінацію або карциноматоз очеревини (КО) при первинній діагностиці виявляють у 5-20 % хворих на рак шлунка [4, 5]. Імплантацийний шлях метастазування характеризується найпесимістичнішим прогнозом з-поміж інших шляхів генералізації, що слугує причиною відмови таким хворим у резекційному об'ємі операції. Так, при виконанні паліативно гастректомії із залишенням поодиноких дисемінатів по очеревині жоден з пацієнтів