

ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ЕРУФОЗИНА ВЪРХУ АДХЕРЕНТНИ ТУМОРНИ И СОМАТИЧНИ КЛЕТКИ. ВЛИЯНИЕ НА ЕЛЕКТРОПОРАЦИЯТА ВЪРХУ КЛЕТЪЧНАТА ЦИТОТОКСИЧНОСТ.

Виктория Пехливанова^{*}, Веселина Узунова^{*}, Яна Цонева^{*}, Мартин Бергер^{***}, Ива Угринова^{**} и Румяна Цонева^{*}

^{*}Институт по биофизика и биомедицински инженерство, Българска академия на науките, София 1113, бл.21, e-mail: tzoneva@bio21.bas.bg

^{**}Институт по молекулярна биология, Българска академия на науките, София 1113, бл.2, e-mail: ugriva2003@yahoo.com

^{***}Германски център за ракови изследвания, Хайделберг 69120, Германия, e-mail: m.berger@dkfz-heidelberg.de

ABSTRACT

Cell adhesion plays a key role in tumor progression and its control could diminish the tumor metastases. In the present study the action of erufosine on reorganization of actin cytoskeleton and apoptosis was analyzed in breast cancer and mammary epithelial cells. The influence of electroporation on cytotoxicity was studied also.

Breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 as well as non-transformed MCF-10A were treated with erufosine (5-15 μ M) or subjected to combine treatment with biphasic electrical pulses. MTS test, actin and DAPI staining were used.

For MDA-MB-231 erufosine provoked apoptosis and actin reorganization, since MCF-7 and MCF-10A were less sensitive to the action of erufosine. The combine treatment with erufosine and electrical pulses lead to stimulation of cell proliferation for MCF-7 and lack of additional effect for MDA-MB-231.

The cytotoxic action of erufosine on breast cancer cells and epithelial cells is cell specific. The most sensitive is the high invasive MDA-MB-231 cell line since 15 μ M erufosine cause cytoskeleton reorganization and apoptosis.

Keywords: erufosine, breast cancer cells, apoptosis, actin cytoskeleton

Увод

Алкилфосфохолините (АРС) са нова група антитуморни агенти, които показват цитотоксична активност срещу различни туморни клетъчни линии *in vitro* и антинеопластична активност *in vivo* [Muschiol C. et al., 1987, Berdel W.E. et al., 1991]. За разлика от стандартните химиотерапия и радиотерапията, които действат на ниво ДНК, АРС са мембранно-въздействащи агенти, които инхибират протеин киназа С и модулират сигналните трансдукционни пътища свързани с клетъчната мембраната [Geilen C. et al., 1991]. Те индуцират апоптоза при много туморни модели [Jendrossek V. et al., 1999, Langen P. et al., 1992] и селективно увреждат левкемични клетки без да засягат (при същите концентрации) нормалните клетки от костния мозък [Konstantinov S. et al., 1998]. Неотдавна бе синтезиран нов алкилфосфохолинов аналог, наречен еруцилфосфо- N,N,N-триметилпропиламоний (ErPC₃, еруфозин). Той е първият агент, който може да се инжектира венозно, няма хемолитични свойства и не проявява цитотоксична активност върху хематопоеични прогениторни клетки, дори напротив има стимулиращ ефект [Hilgard P. et al., 1999]. Веществото проявява повишена цитотоксичност при много левкемични клетъчни линии *in vitro* [M. R. Berger M.R. et al., 1998].

Клетъчната адхезията е фундаментален процес който при нетрансформираните клетки играе ключова роля за клетъчния растеж и преживяемост, тъй като участва в организаницията на тъканите и органите [Hynes R., 2002]. При трансформираните (ракови) клетки, наличието на адхезионни контакти не е условие за растеж и преживяемост [Fish S. and Ruoslahti E., 1997], тъй като основните особености на раковите клетки са намалената

адхезия и дифузна цитоскелетната организация. Промените в тяхното адхезивно поведение определят тяхната модифицирана морфология и миграционен потенциал, на които се дължат инвазивните им свойства през всички етапи на туморогенезиса. По този начин въздействието върху клетъчната адхезия е важна предпоставка за регулиране на растежа и инвазията на туморните клетки.

Установено е, че електричните импулси могат да провокират промени в клетъчната адхезия и цитоскелетната организация. Това може да допринесе впоследствие и до ограничаване на туморната инвазия [Pehlivanova V. et al., 2012]. До сега не са известни данни за действието на алкилфосфохолините върху актиновия цитоскелет.

Целта на настоящето изследване е проследяване ефекта на еруфозина, както самостоятелно, така и в комбинация с биполярни електрични импулси върху процесите на реорганизация на актиновия цитоскелет и клетъчна смърт при адхерентни туморни клетки от рак на гърдата.

Материали и методи.

Еруфозин - синтезиран е в Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany и е любезно предоставен от Проф. М. Бергер. Разтваря се в PBS (phosphate buffer saline) рН 7.4 и етанол (1:1, v/v) и се съхранява при 4°C.

Клетъчни линии и условия за култивиране. Използвани са две туморни линии от рак на гърдата MDA-MB-231 и MCF-7 (ATCC) и една нетрансформирана клетъчна линия MCF 10A (ATCC) от епителни клетки на млечна жлеза. Условията на култивиране са описани в наша предишна статия [Pehlivanova V. et al., 2012]. Клетъчна суспензия с концентрация 1.5×10^5 кл/мл се посява в 24 ямкови култивационни плаки или върху предметни стъкла (18mm x 18mm, Deckglaser) поставени в 6 ямкови плаки. Клетките се икубират 24 часа при 37°C и 5% CO₂.

Третиране с еруфозин. След 24-часовата инкубация клетките се третират с 5µM, 10µM и 15µM разтвор на еруфозин и се инкубират допълнително съответно за 2, 24 и 72 часа.

Електротретиране. Условията на електротретиране и апарата са описани в предишна наша статия [Pehlivanova V. et al., 2012]. Накратко, адхезиалите клетки се третират с постоянно биполярно електрично поле (интезитет 200V/cm и 300V/cm) 5 минути след добавяне на лекартството и се инкубират допълнително за 24 часа.

Оцветяване за актин. След 24 ч. инкубация с еруфозин клетките са оцветени за актин с BODIPY 558/568 Phalloidin (Invitrogen) както сме описали по-рано [Pehlivanova V. et al., 2012] и се анализират с флуоресцентен микроскоп.

Оцветяване на ядрото с DAPI. След третиране с еруфозин за 24 часа, клетките се промиват с PBS и се оцветяват с DAPI (1 µg/ml в PBS). Препаратите се съхраняват на тъмно при 4°C и се анализират с флуоресцентен микроскоп.

MTS тест за клетъчно преживяване и пролиферация. Количеството на преживелите клетки след третиране с еруфозин и електрично поле беше определено чрез MTS тест (Promega) описан по-рано [Pehlivanova V. et al., 2012].

Резултати

Клетъчна преживяемост и цитотоксичност при третиране с еруфозин. Клетъчната преживяемост и при трите адхерентни клетъчни линии не беше повлияна 2 часа след третиране с еруфозин с концентрации 5µM, 10µM и 15µM (Фиг. 1). Нетрансформираната епителна клетъчна линия MCF-10A остава като цяло нечувствителна на действието на лекартството и след по-дълъг период на третиране (24 и 72 часа) (Фиг.1). При MCF-7 се наблюдава забавяне на пролиферационната активност след 72 ч. при третирането с 5 µM еруфозин. Най-чувствителна към действието на еруфозина е инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231. Пролиферационната активност намалява на 24-я час след третиране с 5 µM и

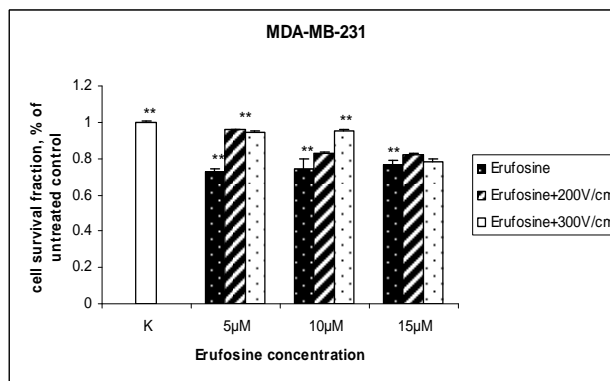
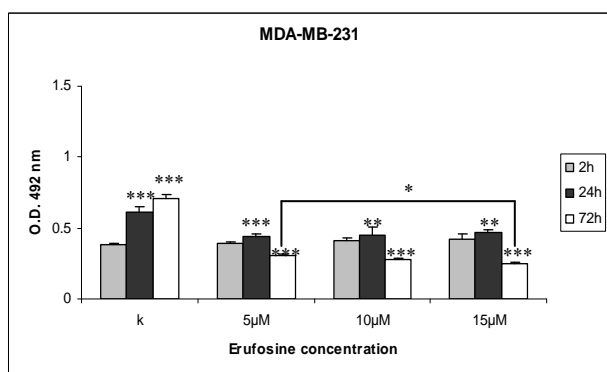
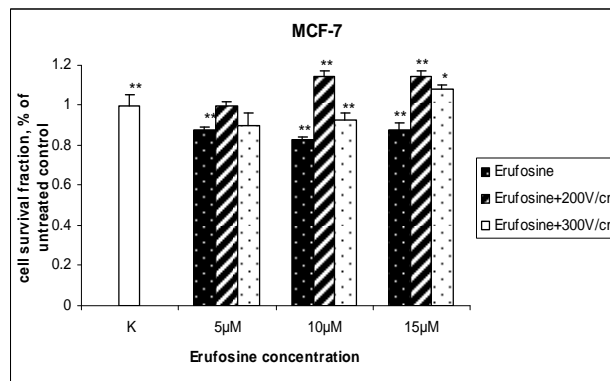
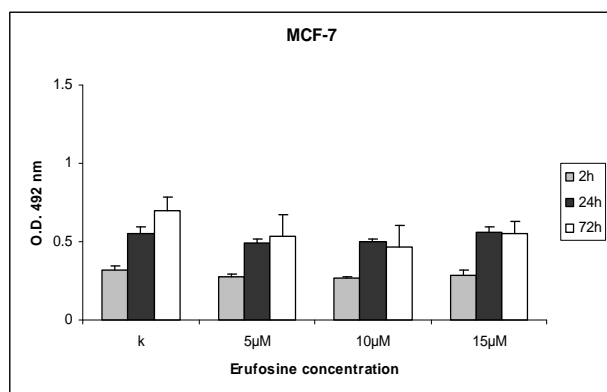
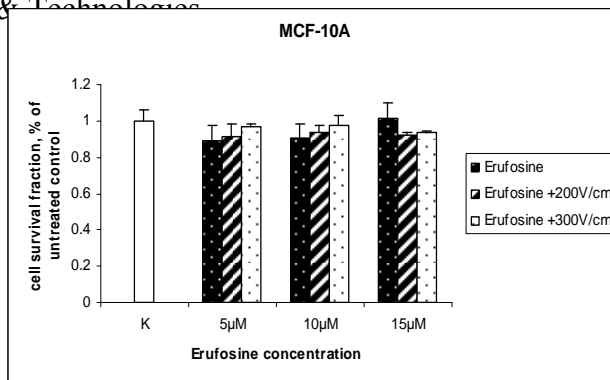
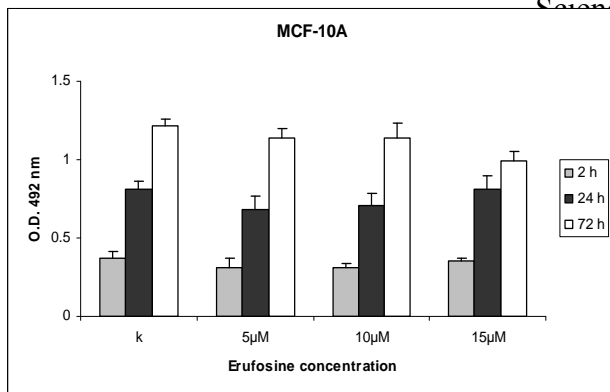
по-високи концентрации на еруфозин, като след 72 ч. се достига IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) ниво при $5 \mu M$ еруфозин (Фиг. 1).

Индукция на клетъчна смърт и промяна в адхезивното поведение на клетки третиране с еруфозин. Третирането на MDA-MB-231 с $15 \mu M$ еруфозин предизвиква свиване на ядрото, хроматинова кондензация и ядрено фрагментиране (Фиг. 2, G). За разлика от MDA-MB-231, ядрата на MCF-10A и MCF-7 не претърпяха никакви забележими промени при третиране с горната концентрация на лекарството. При проследяване на адхезионното поведение на MDA-MB-231 се забелязва, че същата концентрация на еруфозин ($15 \mu M$) предизвикваща апоптоза (Фиг.2,G) провокира засилена адхезия и разстилане на клетките, както и появата на актинови структури като ламелоподии и филоподии по клетъчната повърхност (Фиг. 2, H). При другите две линии MCF-10A и MCF-7 не се наблюдава промяна в адхезионното поведение след третиране с еруфозин.

Клетъчна преживяемост и цитотоксичен ефект при комбинирано третиране с еруфозин и електрично поле. Прилагането на еруфозин в комбинация с електрично поле при MCF-10A не доведе до засилване на токсичния ефект на еруфозина (Фиг.3). При MCF-7 се наблюдава активиране на клетъчната пролиферация при прилагане на електрично поле в комбинация с $10 \mu M$ и $15 \mu M$ еруфозин (Фиг.3). При MDA-MB-231 под действието на електрично поле цитотоксичния ефект на еруфозина ($5 \mu M$ и $10 \mu M$) намалява значително. Приложеното електрично поле при $15 \mu M$ еруфозин практически не оказва допълнително влияние върху клетъчната токсичност (Фиг.3).

Обсъждане

Еруфозина се оказва добър кандидат за антитуморна терапия на рак на гърдата. Нашето изследване проведено върху адхерентни туморни и нетрансформирани соматични клетки показва най-голяма токсичност на еруфозина към високоинвазивната туморна линия MDA-MB-231 и липсата на токсичност при нормални епителни клетки. Други автори също потвърждават липсата на токсичност и дори наблюдават стимулиращ ефект на еруфозина към нормални нетрансформирани хематопоеични клетки [Hilgard P. et al., 1999; Yosifov D. et al, 2010]. В тази връзка е интересен и фактът, че при третиране с електрично поле и ниски концентрации на еруфозин се наблюдава стимулиращ ефект при MCF-7 или липса на допълнителен ефект при MDA-MB-231. Наблюдавана е една нова закономерност при инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 - реорганизация на актиновия цитоскелет като отговор от третиране с еруфозин наред със запускане процеса на апоптоза. Подобна склонност към сформирание на адхерентен клетъчен фенотип след третиране с еруфозин показва и левкемичната клетъчна линия LAMA-84 [Konstantinov S. Et al, 1999]. Но за разлика от нашето изследване тази клетъчна линия показва доста висока цитотоксична резистентност (IC_{50} -21-91 μM). Вероятно при високоинвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 под действието на еруфозина се задействат специфичните сигнални пътища регулиращи актиновата реорганизация и клетъчната туморна миграция като важна роля в тях играят актин свързващите белтъци от Rho семейството на малките GTP-ази [Jiang P. et al., 2009]. Изясняването на тези специфичните сигнални пътища, повлияни от действието на еруфозина ще бъде обект на наши бъдещи изследвания

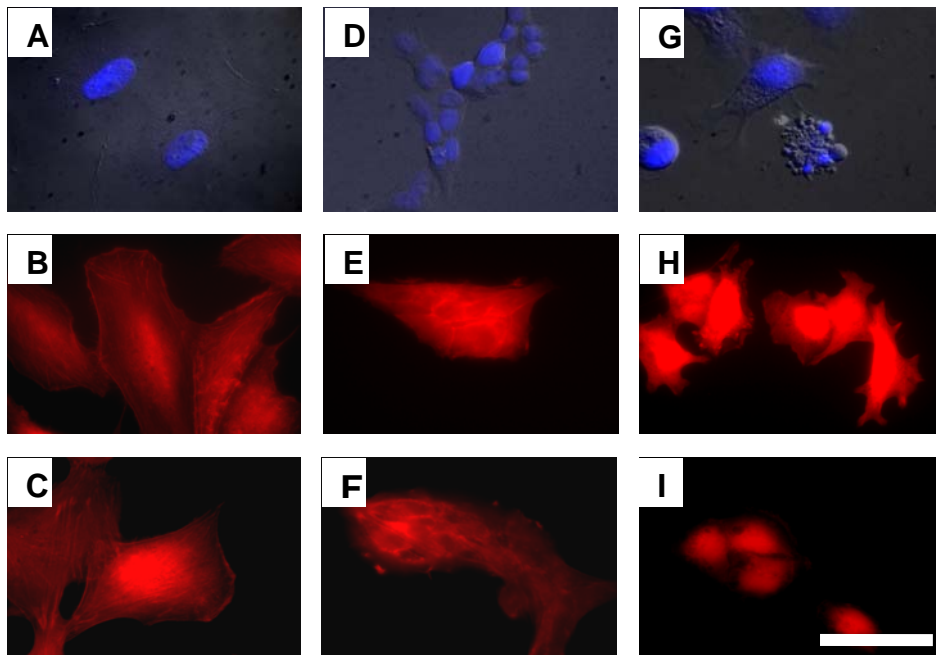


Фиг. 1 Клетъчна преживяемост и пролиферация на клетки третирани с различни концентрации на еруфозин за 2, 24 и 72 часа. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey–Kramer post тест (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Фиг. 3 Клетъчна преживяемост на клетки третирани с различни концентрации на еруфозин и електрично поле (200V/cm и 300V/cm) за 24 часа. Данните са нормализирани спрямо контролата. Статистиката е направена с ANOVA one-way тест и Tukey–Kramer post тест (** $p < 0.01$).

Изводи

1. Цитотоксичното действие на еруфозина върху адхерентни туморни и соматични клетки е клетъчно специфично. Най-чувствителна е високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231, а нечувствителна е нетрансформираната клетъчна линия MCF-10A.
2. Определени концентрации на еруфозина (15 µM) предизвикват клетъчна смърт и провокират адхерентен клетъчен фенотип при високометастатичната клетъчна линия MDA-MB-231.
3. Прилагането на биполярно електрично поле със средни интензитети и ниски концентрации на еруфозин има стимулиращ ефект върху неинвазивните MCF-7 и не води до допълнителен цитотоксичен ефект при високоинвазивните MDA-MB-231.



Фиг.2 Ефект на еруфозина върху клетъчното ядро и актиновия цитоскелет. MCF-10A (A, B, C), MCF-7 (D, E, F) и MDA-MB-231 (G, H, I) третирани с 15 μ M еруфозин и оцветени с DAPI (горен панел) и BODIPY/Phalloidin (среден панел). Долен панел – оцветяване за актин на нетретирани клетки. Бар-50 μ m.

Литература

1. **Berdel, W.**, 1991. Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs, *British journal of cancer*, 64, 208–211
2. **Berger, M.**, S. Sobottka, S. M. Konstantinov, H. Eibl, 1998. Erucylphosphocholine is the promototype of i.v. injectable alkylphosphocholines, *Drugs of today*, 34, 73-81
3. **Fish, S.**, E. Ruoslaht, 1997. Integrins and anoikis, *Current opinion in cell biology*, 9, 7001-7006.
4. **Geilen, C.**, R. Haase, K. Buchner, T. Wieder, F. Hucho, W. Reutter, 1991. The phospholipid analogue, hexadecylphosphocholine, inhibits protein kinase C in vitro and antagonizes phorbol ester-stimulated cell proliferation, *European Journal of Cancer*, 27, 1650-1653
5. **Hilgard, P.**, T. Klenner, J. Engel, 1999. Inhibitors of the signal transduction: the alkylphosphocholines, *Drug news and perspectives*, 12, 69-72
6. **Hynes, R.**, 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*, 110, 673–687
7. **Jendrossek, V.**, B. Erdlenbruch, A. Hunold et al, 1999. Erucylphosphocholine, a novel antineoplastic ether lipid, blocks growth and induces apoptosis in brain tumor cell lines in vitro, *International journal of oncology*, 14, 15–2
8. **Jiang P.**, A. Enomoto, M. Takahashi, 2009. Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signaling and the actin cytoskeleton, *Cancer Letters*, 284, 122-130
9. **Konstantinov, S.**, H. Eibl, M.R. Berger, 1999. BCR-ABL influences the antileukemic efficacy of alkylphosphocholines, *British Journal of Haematology*, 107, 365-374
10. **Konstantinov, S.**, M. Topashka-Ancheva, A. Benner, M.R. Berger, 1998. Alkylphosphocholines: effects on, human leukemic cell lines and normal bone marrow cells, *International journal of cancer* 77, 778–786
11. **Langen, P.**, H.R. Maurer, H. Brachwitz et al, 1992. Cytostatic effects of various alkyl phospholipid analogues on different cells in vitro, *Anticancer research*, 12, 2109–2112
12. **Muschio, C.**, M.R. Berger, B. Schuler, H.R. Scherf, F.T. Garzon, W.J. Zeller, C. Unger, H.J. Eibl, D. Schmahl, 1987. Alkyl phosphocholines: toxicity and anticancer properties, *Lipids*, 22, 930–934
13. **Pehlivanova, V.**, I. Tsoneva, R. Tzoneva, 2012. Multiple effects of electroporation on the adhesive behaviour of breast cancer cells and fibroblasts, *Cancer Cell International*, 12, 9

Настоящото изследване е осъществено с финансовата подкрепа на договор ДО 02/178, НТС 01/110, финансиран от ФНИ, България.