

## КОМБИНИРАНО ВЛИЯНИЕ НА НОВИЯ АНТИ-ТУМОРЕН АГЕНТ ЕРУФОЗИН И ЕЛЕКТРИЧНО ПОЛЕ ВЪРХУ КЛЕТКИ ОТ РАК НА ГЪРДАТА

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: ugryiva2003@yahoo.com

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

### ABSTRACT

Breast cancer is a disease with a high metastatic potential, and in many cases leads to a resistance to applied standard anti-cancer drugs. This necessitates to looking for more effective anti-tumor agents and combined approaches for cancer therapy. The action of erufosine and electrical field on cell survival, reorganization of cytoskeleton, and cell cycle was analyzed in breast cancer and mammary epithelial cells. Breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 as well as the non-tumorigenic line MCF-10A were treated with erufosine (5  $\mu$ M to 50  $\mu$ M) and electrical field (500 V/cm and 100V/cm). MTS test, FACS analysis and actin staining were performed. In MDA-MB-231 cells erufosine in combination with the electric field induces a significant reduction in cell survival and depolymerization of the actin cytoskeleton. There are also changes in the cell cycle of treated MDA-MB-231 cells, which is an increase of G2/M phase, indicating the existence of mitotic cell arrest. MCF-7 and MCF-10A are less sensitive to the combined treatment. Application of electrical pulses has an additive effect on enhancing the antitumor activity of erufosine. The most sensitive to the combined treatment with erufosine and electric field is highly invasive cell line MDA-MB-231.

**Keywords:** erufosine, electric field, actin cytoskeleton, cell cycle

**Увод.** Алкилфосфохолините (АФХ) са нова група анти-туморни агенти, които показват цитотоксична активност срещу различни туморни клетъчни линии *in vitro* и антинеопластична активност *in vivo*<sup>[1]</sup>. За разлика от класическите цитостатици, които действат на ниво ДНК (антрациклини, таксани, антибиотика блеомицин, цисплатина и др.), алкилфосфохолините проявяват своето действие на ниво клетъчна мембрана<sup>[11]</sup>. Голямо разнообразие от цитотоксични механизми са приписани на алкилфосфохолиновите компоненти. Сред тях са промяна на протеин киназите и фосфолипазите, инхибиране на фосфатидилхолиновия синтез, активиране на SAPK/JNK сигнален път<sup>[12]</sup> и др. Наскоро е синтезиран нов алкилфосфохолинов препарат, наречен erucylphospho-N, N, N-trimethylpropylammonium. Агентът може да стимулира продукцията на хематопоеичните прогениторни клетки<sup>[12]</sup>. Показано е, че еруфозинът индуцира апоптоза и автофагия чрез модулиране на Akt-mTOR сигнален път<sup>[4]</sup>. Клетъчната адхезия е фундаментален процес, който в нетуморогенните клетки играе ключова роля в клетъчни растеж, тъй като поддържа организацията на тъканите и органите. При туморогенните клетки присъствието на адхезионни контакти не е предпоставка за растеж и оцеляване<sup>[3]</sup>. Промените в клетъчната адхезия определят модифицираната им морфология и миграция, което е свързано с техните инвазивни свойства по време на всички стадии на туморното развитие. По този начин манипулирането на клетъчната адхезия е важна предпоставка за контролиране на туморния растеж и инвазия. Основна роля в клетъчната адхезия играе актиновия цитоскелет. Наши предходщи изследвания показаха, че електрични импулси предизвикват промени в клетъчната адхезия и цитоскелетна организация<sup>[7]</sup>, а еруфозинът причинява клетъчна смърт и провокира адхерентен клетъчен фенотип<sup>[8]</sup>. Досега няма данни за комбинираното действие на

еруфозин и електрично поле върху цитоскелета на адхерентни туморни клетки и клетъчната преживяемост. Целта на настоящето изследване е да се изучи комбинирания ефект върху клетъчната преживяемост, причиняването на клетъчна смърт и реорганизация на цитоскелета на туморни и нетуморогенни клетки.

**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) pH 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 нетуморогенна клетъчна линия MCF 10A (ATCC) от епителни клетки на млечна жлеза. Условията на култивиране са описани в [7]. Клетъчна суспензия с концентрация  $1.5 \times 10^5$  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% CO<sub>2</sub> *Третиране с еруфозин.* След 24-часовата инкубация клетките се третират с 5µM, 10µM и 15µM еруфозин и се икубират допълнително съответно за 2, 24 и 72 часа. *Електротретиране.* Условията на електротретиране и апарата са описани в [7]. Накратко, адхезираните клетки се третират с постоянно биполярно електрично поле (интензитет 500V/cm и 1000V/cm) 5 минути след добавяне на лекарството и се икубират 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 [7] и се анализират с инвертен 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 [7]. *FACS анализ.* Методът е предварително описан [8]. Накратко, 24 часа след третиране с еруфозин и електрично поле клетките са третирани последователно с етанол и Rnase A и оцветени с пропидиев йодид. Пробите се анализират с BD FACS Calibur flowcytometer при 585nm.

**Резултати и дискусия. Клетъчна преживяемост и цитотоксичност.** MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231 клетъчни линии са третирани с 5µM, 10µM и 15µM еруфозин, самостоятелно и в комбинация с приложено електрично поле с интензитети 500V/cm и 1000V/cm за 24 часа.

При MCF -7 и нетуморогенната клетъчна линия MCF-10 не се наблюдава разлика в преживяемостта на клетките, третирани едновременно с еруфозин и електрично поле спрямо тази при клетки, третирани само с еруфозин или електрично поле, като тя е в порядъка от 85 - 95 % спрямо контролата (данните не са показани).

Инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231 показва концентрационно зависимо намаляване на преживяемостта, както при самостоятелното използване на еруфозин, така и в комбинация с приложено електрично поле (Фиг. 1.).

Най-чувствително редуциране на пролиферативната активност се наблюдава при комбинираното третиране на MDA-MB-231 с 15µM еруфозин и електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm (Фиг. 2.). Прилагането на 15µM еруфозин и електрично поле самостоятелно довежда до клетъчна преживяемост от 80% спрямо контролата. При едновременното прилагане на 15µM еруфозин и електрично поле се наблюдава рязко намаляване на пролиферативната активност на 50% (IC<sub>50</sub>).

**Реорганизация на цитоскелет и индуциране на клетъчна смърт.** След 24 часа инкубация с еруфозин в комбинация с електрично поле, клетките са оцветени за актин с BODIPY 558/568 Phalloidin и са анализирани с инвертен флуоресцентен микроскоп. Получените резултати са представени на Фиг. 3. Установена е промяна само в цитоскелета на инвазивната клетъчна линия MDA-MB-231, като се наблюдава деполимеризиране на актиновите филаменти и дифузното им разпределение в клетката дори и при ниски концентрации на еруфозин - 5µM (Фиг. 3. Б, В, Г). Докато при контролни клетки (Фиг. 3. Д)

и клетки третираны само с електрично поле (Фиг. 3.А) се визуализират добре оформени стрес фибри (стрелки на Фиг. 3.А, Д) разположени по дължината на клетъчното тяло. Това изменение в организацията на актиновия цитоскелет води до слаба клетъчна адхезия и е най-вероятната причина за намалената (50%) клетъчна преживяемост констатирана на Фиг. 2.

**Флоуцитометрия.** Клетките са третираны с 15 $\mu$ М и 50 $\mu$ М еруфозин и съответно 500V/cm или 1000V/cm електрично поле и са инкубирани за 24 часа. За определяне на количеството на клетките в различните фази на клетъчния цикъл е направен анализ чрез флоуцитометрия.. Данните са сравнени с нетретираните контролни клетки (Фиг. 4. А и Б). Изследвани са двете ракови клетъчни линии, тъй като само те показаха забележим ефект от действието на еруфозина.

На Фиг. 4. А е показан жизненият цикъл на MCF-7, третираны самостоятелно с еруфозин, и в комбинация с електрично поле. Sub-G1 популация (апоптотични клетки) се наблюдава при третиране на MCF-7 клетките с еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле (Фиг. 4. А). FACS анализът в контролните клетки и клетките, третираны с 1000V/cm показва 1% Sub-G1 популация на клетки с хипо-диплоидно ДНК съдържимо. При клетките третираны с 15 $\mu$ М еруфозин и 500V/cm или 1000V/cm електрично поле апоптотичната популация възлиза на 10-15%. Много чувствително нараства тази фаза при клетки, третираны с 50 $\mu$ М еруфозин и 500V/cm електрично поле – около 30%. А при 50 $\mu$ М еруфозин и 1000V/cm електрично поле повече от половината клетки (60%) се намират в апоптотична (sub G1) фаза.

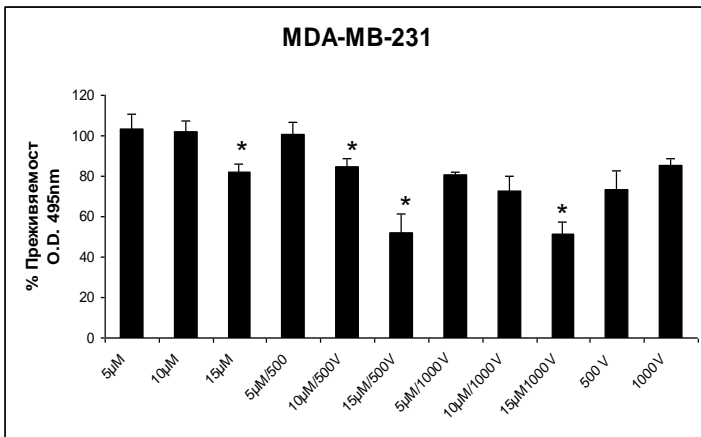
При третиране на MDA-MB-231 с еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле, се наблюдава същата тенденция на нарастване на Sub-G1 фазата при комбинираното прилагане на анти-туморния агент и електричното поле (Фиг. 4. Б). Интересното тук е същественото увеличаване на G2/M популацията при прилагането на 15 $\mu$ М еруфозин и електрично поле (500V/cm или 1000V/cm). Докато при контролните клетки и клетки, третираны само с 1000V/cm електрично поле клетъчната популация в G2/M възлиза на 25-30%, то при клетки, третираны с 15 $\mu$ М еруфозин и електрично поле размерът на тази популация нараства до 40% (Фиг. 4. Б). При третирането на клетките с високи дози еруфозин (50 $\mu$ М) и електрично поле (Фиг. 5.) относителният дял на G2/M фазата пада до 10-15% най-вероятно поради нарастващия дял на апоптотични клетки (60% при клетки третираны с 15 $\mu$ М и 1000V/cm електрично поле).

Увеличаването на G2/M фазата при комбинираното третиране на MDA-MB-231 с 15 $\mu$ М еруфозин и електрично поле може да бъде обяснено с възникване на клетъчен арест поради нарушаване най-вероятно на регулатора между G2 и M фазата и възникването на т. нар. митотична катастрофа и формирането на огромни (giant) клетки<sup>[2]</sup>. Това би обяснило задържането на повече клетки в тази фаза и увеличаване на относителен дял. Съществуват изследвания, според които митотична катастрофа може да бъде предизвикана от различни анти-ракови лекарства, причиняващи промени в цитоскелета, най-вече  $\beta$ -тубулинова дестабилизация<sup>[6]</sup>, както и от йонизиращи лъчения<sup>[10]</sup> и други химични и физични агенти<sup>[5]</sup>. Като резултат, ядрената организация се нарушава, и на по-късен етап клетката навлиза в процес на клетъчна смърт<sup>[9]</sup>. Нашите изследвания за първи път демонстрират комбинираното влияние на еруфозина и приложеното електрично поле върху клетъчния цикъл на MDA-MB-231. Тези пилотни изследвания са много обнадеждаващи и дават основание за бъдещи изследвания, свързани с изясняване на точния механизъм за възникване на митотичен арест под действието на еруфозин и електрично поле при високомета статичната клетъчна линия MDA-MB-231.

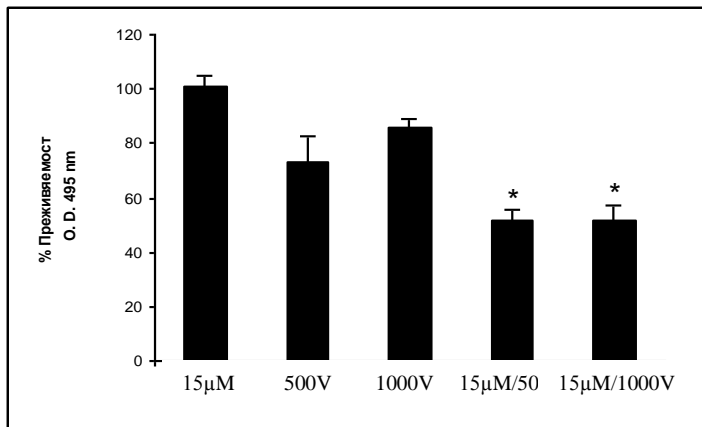
**Обобщение.** При комбинираното действие на електрично поле с еруфозин най-чувствителна е високомета статичната клетъчна линия MDA-MB-231. Приложеното електрично поле (500 V/cm и 1000 V/cm) заедно с ниски дози еруфозин (15 $\mu$ М) води до

драстично намаляване на клетъчната преживяемост на 50% ( $IC_{50}$ ), деполимеризация на актиновите филаменти и тяхното дифузно разпределение при MDA-MB-231 за разлика от добре оформените актинови стрес фибри при самостоятелното действие на еруфозин и електрично поле. Също така при изучаване на клетъчния цикъл и запускане на апоптоза и при двете ракови линии се установи, че апоптотичната фаза е значително по-висока при клетки третирани едновременно с еруфозин и електрично поле, отколкото при самостоятелно третиране с електрично поле или еруфозин. При MDA-MB-231 за първи път се демонстрират факти, свидетелстващи за наличие на клетъчен арест и предизвикване на митотична катастрофа при третирането им в комбинация от еруфозин и електрично поле.

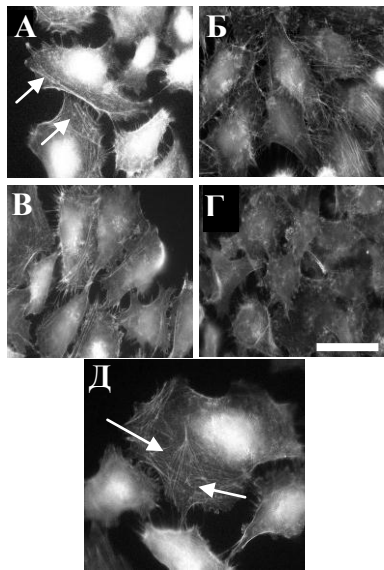
Проведените изследвания показват, че еруфозинът в комбинация с високоволтови електрични импулси може да се окаже една нова и ефективна терапия за третиране на метастатичния рак на гърдата с незначителни ефекти върху нормалната тъкан.



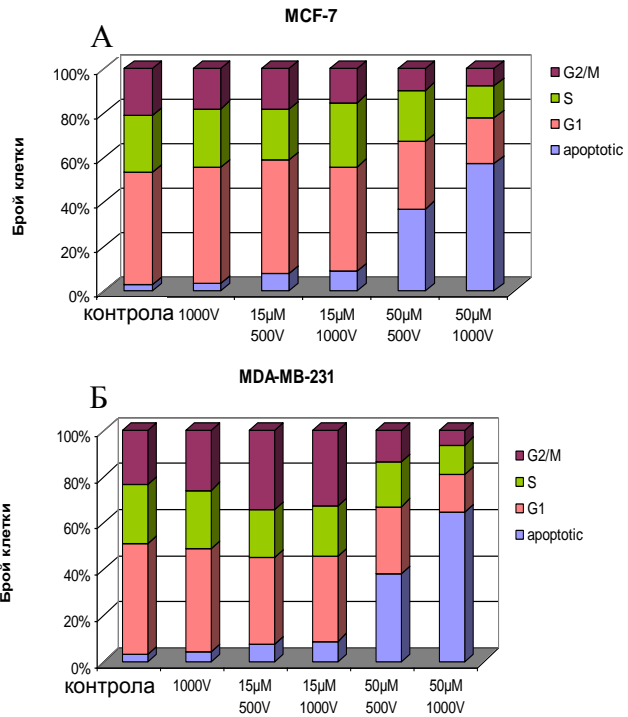
**Фиг.1.** Пролиферативна активност на MDA-MB-231 клетки третирани с 5µM, 10µM и 15µM еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm. Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.



**Фиг. 2.** Пролиферативна активност на MDA-MB-231 клетки третирани с 15µM еруфозин самостоятелно и в комбинация с електрично поле с интензитет 500V/cm и 1000V/cm. Посоченият волтаж отговаря на интензитета във V/cm.



**Фиг. 3.** Ефект на еруфозин и електрично поле върху актиновия цитоскелет на MDA-MB-231. А-1000V/cm, Б-5µM/1000V/cm, В-10µM/1000V/cm, Г-15µM/1000V/cm, Д-контрола.



**Фиг. 4.** Влияние на електрично поле върху клетъчния цикъл. Волтажът отговаря на интензитета V/cm.

**References.**

1. Berdel, W., 1991. Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs, *British Journal of Cancer*, 64, 208–211
2. Erenpreisa J.A., M. S. Cragg, 2001. Mitotic death: a mechanism of survival?, *A review, Cancer Cell International*, 1, 1-7
3. Fish, S., E. Ruoslaht, 1997. Integrins and anoikis, *Current opinion in cell biology*, 9, 7001-7006
4. Kapoor V., M. M. Zaharieva, N. Satya, M. R. Berger, 2012. Erufosine simultaneously induces apoptosis and autophagy by modulating the Akt–mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma, *Cancer Letters*, doi:10.1016/j.canlet.2011.12.032
5. Mansilla S., M. Bataller, J. Portugal, 2001. Mitotic catastrophe as a consequence of Chemotherapy, *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6, 589-602
6. McIntosh J.R., 1984. Cell biology. Microtubule catastrophe, *Nature*, 312, 196- 197
7. 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
8. Pehlivanova V. V. Uzunova, I. Tsoneva, M Berger, I. Ugrinova, R. Tzoneva, DOI:10.5504/BBEQ.2012.0120, *Medical Biotechnology*
9. Roninson I.B., E. V. Broude, B. D. Chang, 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells, *Drug Resistance Updates*, 4, 303-313
10. Spear F.G., A. Glucksmann, 1941. The effect of gammaradiation on cells in vivo. (Part III), *British Journal of Radiology*, 14, 65-77
11. Unger C., H. Sindermann, M. Peukert, P. Hilgard, J. Engel, H. Eibl, 1992. Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer Patients, *Progress in Experimental. Tumor Research*, 34, 153- 159
12. Yosifov D., P. Todorov, M. Zaharieva, K. Georgiev, B. Pilicheva, S. Konstantinov, M. R. Berger, 2011. Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67, 13-25