

Ю.А. Хоченкова, Э.Ш. Соломко, О.О. Рябая, Е.В. Степанова, Д.А. Хоченков

Противоопухолевое действие сунитиниба и бортезомиба на клетки рака молочной железы *in vitro*

ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Поиск эффективных сочетаний противоопухолевых препаратов для лечения рака молочной железы представляет актуальную задачу в экспериментальной химиотерапии. Проведено изучение противоопухолевого действия комбинации сунитиниба и бортезомиба в отношении клеточных линий MDA-MB-231 и SKBR-3 *in vitro*. Согласно полученным данным, бортезомиб в нецитотоксических концентрациях потенцирует действие сунитиниба, причем клеточная линия MDA-MB-231 проявила большую чувствительность к комбинации бортезомиба и сунитиниба *in vitro*. Бортезомиб и сунитиниб вызывают снижение экспрессии рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , PDGFR β и c-Kit в HER2⁻ и HER2⁺ клеточных линиях РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, сунитиниб, бортезомиб, комбинированная терапия *in vitro*

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных типов рака у женщин. В патогенезе РМЖ значительное место занимают сигнальные пути, связанные с рецепторами фактора роста эндотелия сосудов (VEGFRs), фактора роста тромбоцитов (PDGFRs) и фактора роста стволовых клеток (c-Kit/CD117) [3]. Согласно данным Jansson et al., при трижды негативном раке молочной железы (ТНР) отмечается высокая экспрессия трех рецепторных тирозинкиназ VEGFR2, PDGFR α и c-Kit по сравнению с другими типами РМЖ – в 73,5% ТНР присутствовала высокая экспрессия по крайней мере одного из трех исследованных рецепторов по сравнению с 30,0% у не-ТНР [8]. PDGFR-зависимый сигнальный путь играет важную роль при эпителиально-мезенхимальном переходе, когда эпителиальные клетки приобретают фенотип мезенхимальных клеток, что приводит к более агрессивному течению метастатического РМЖ [7].

Сунитиниб ингибирует рецепторные тирозинкиназы – PDGFR β , VEGFR2, c-Kit, CSF1R и FLT-3 [9]. В настоящее время этот препарат одобрен FDA для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей, нейроэндокринных опу-

холей поджелудочной железы и почечно-клеточного рака. В то же время, результаты применения сунитиниба при РМЖ имеют противоречивый характер. Сравнительное изучение применения сунитиниба в режиме монотерапии не показало его преимущества по сравнению с капецитабином у пациентов с HER2-отрицательным РМЖ. При исследовании эффективности сунитиниба в комбинации с доцетакселом или с капецитабином в III фазе клинических исследований у больных с HER2-отрицательным РМЖ не было установлено повышения эффективности лечения при добавлении сунитиниба к стандартной химиотерапии [4,5].

Другим важным элементом функционирования опухолевых клеток являются протеасомы, которые отвечают за регулирование значительной части внутриклеточных белков, участвующих в клеточном цикле и в индукции апоптоза: циклины, каспазы, ядерный фактор κ B (NF- κ B) и другие [1]. Из-за генетической нестабильности и высокой пролиферативной активности, опухолевые клетки более, чем нормальные клетки, зависимы от функционирования протеасом, необходимых для удаления аномальных внутриклеточных белков. В итоге, ингибирование протеасом вызывает нарушение клеточной активности и приводит к гибели опухолевых клеток [6].

Бортезомиб – ингибитор протеасомы 26S, селективно вызывающий апоптоз большинства опухолевых клеток, был одобрен для лечения многих гематологических злокачественных новообразований. Однако, результаты клинических исследований показывают, что применение бортезомиба в режиме монотерапии или в комбинации с цитостатическими химиопрепаратами не всегда достаточно эффективно при лечении больных РМЖ [11,13].

Использование комбинации сунитиниба и бортезомиба представляется перспективным. Установлено, что совместное применение данных препаратов вызывает снижение жизнеспособности клеток меланомы и увеличивает апоптотическую гибель в клеточных линиях, чувствительных к сунитинибу [14]. Более того, было показано, что сунитиниб потенцирует действие бортезомиба за счет уменьшения бор-

тезомиб-индуцированной активации NF-κB в клетках карциномы эндометрия, что приводит к повышению чувствительности к бортезомиду и апоптотической гибели клеток [12].

В данной работе представлены результаты исследования эффективности противоопухолевого действия комбинации таргетных препаратов сунитиниба и бортезомиба в отношении перевиваемых клеточных линий РМЖ SKBR-3 и MDA-MB-231 *in vitro* и изучено их влияние на экспрессию рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2, PDGFRα, PDGFRβ, c-Kit в клетках РМЖ.

Материалы и методы

Клеточные линии. Исследование проводили на двух клеточных линиях РМЖ человека: MDA-MB-231 (CRM-NTB-26™), относящейся к трижды негативному типу и HER2-положительной линии SKBR-3 (NTB-30™) (ATCC). Клеточные линии культивировали на полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (ЭТС, NuClone, США); 2 мМ/мл глутамин, 50 мг/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3-4 дня.

Препараты

В работе были использованы противоопухолевые ингибиторы Сунитиниб (SU11248) и Бортезомиб (Selleckchem, США), растворенные в ДМСО согласно рекомендациям производителя.

Метод оценки цитотоксического действия препаратов (MTT-тест)

Клетки вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты по 8×10^3 клеток на лунку в полной среде. Через 24 часа в лунки с клетками добавляли исследуемые препараты в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-9} моль и инкубировали в течение 48 час при 37°C и 5% CO₂. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и оставляли на 4 часа в CO₂-инкубаторе, затем среду отбирали и вносили в лунки по 200 мкл ДМСО (Sigma, США) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре «Multiscan EX» (Thermo Scientific, США) при 540 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Для препарата строили график зависимости «доза-эффект» и определяли IC₅₀.

Иммуноцитохимический анализ рецепторов VEGFR1, VEGFR2, PDGFRα, PDGFRβ и c-Kit

Клетки в равном количестве (4×10^4 клеток/мл) наносили на 8-луночные слайд-камеры (Nunc, Дания). Через сутки в лунки добавляли препараты сунитиниба в концентрации 1 мкМ и бортезомиб в концентрации 7,5 нМ, в контрольных лунках клетки оставляли без препарата. Через 24 ч инкубации стекла промывали, фиксировали в спирте и ацетоне и проводили иммуноцитохимическое окрашивание клеток со следующим набором первичных антител: VEGFR1 (1:100, Abcam, США), VEGFR2 (1:100), PDGFRα, PDGFRβ (оба 1:400, Santa Cruz Biotechnology, США) и c-Kit/CD117 (1:200, Dako, Дания), при +4°C в течение 18 часов. После чего клетки промывали и инкубировали с вторичными антителами, меченными флуорохромом AlexaFluor® 488 (1:2000, Life Technologies, США), а затем с красителем Хехст 33258 (ПанЭко, Россия). Клетки заключали под

покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Анализ образцов проводили при помощи аппаратно-программного комплекса для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare, Великобритания).

Результаты и обсуждение

Предварительно было определено цитотоксическое действие таргетных противоопухолевых препаратов бортезомиба и сунитиниба на перевиваемых клеточных линиях РМЖ – SKBR-3 и MDA-MB-231 при помощи МТТ-теста. Эффективность цитотоксического действия препаратов оценивали по IC₅₀ – концентрации лекарственного средства, вызывающей потерю жизнеспособности у 50% клеток. По результатам экспериментов были построены логарифмические графики зависимости «доза-эффект» (рис.1). Значения IC₅₀ для клеточных линий РМЖ были рассчитаны при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 5,0.

К таргетным противоопухолевым препаратам обе перевиваемые клеточные линии РМЖ проявили сходную чувствительность – для сунитиниба IC₅₀ составила $1,1 \times 10^{-5}$ М для SKBR-3 и $1,3 \times 10^{-5}$ М для MDA-MB-231. При применении бортезомиба IC₅₀ составила $2,5 \times 10^{-8}$ М для SKBR-3 и немного больше активность бортезомиба в отношении клеточной линии MDA-MB-231 – $1,6 \times 10^{-8}$ М. На основании полученных данных стало возможным изучение чувствительности клеточных линий РМЖ под действием комбинации сунитиниба и бортезомиба.

Применение комбинации бортезомиба и сунитиниба может синергически увеличивать противоопухолевую активность и преодолевать специфическую резистентность клеточных или антиапоптотических механизмов, в том числе и за счет ингибирования бортезомиб-индуцированной NF-κB-зависимой транскрипционной активности. Исследование эффективности комбинации на линиях РМЖ MDA-MB-231 и SKBR-3 было проведено методом МТТ. Бортезомиб вносили в наиболее эффективных нецитотоксических концентрациях от 7,5 нМ до 1 нМ, которые подбирались, согласно значениям IC50 для каждой из исследуемых клеточных линий, концентрация сунитиниба варьировала в диапазоне от 0,1 до 10 мкМ. Полученные результаты представлены на рис.2.

Согласно полученным данным, добавление бортезомиба в нецитотоксической концентрации 5 нМ вызывает значительную гибель клеток ТНР линии MDA-MB-231 при нецитотоксических концентрациях сунитиниба 0,1–10 мкМ, в случае линии SKBR-3 потенцирование цитотоксического действия сунитиниба было менее выраженным. Увеличение концентрации бортезомиба до

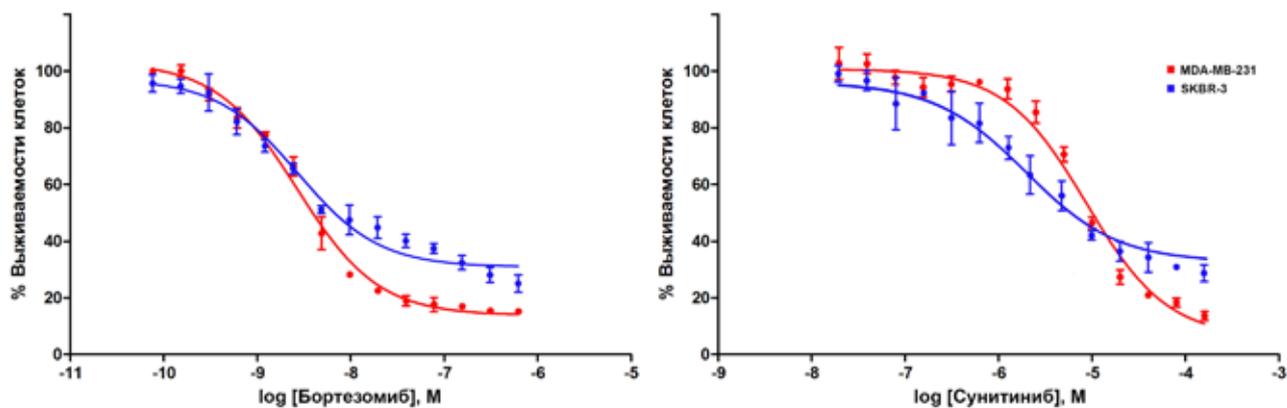


Рис.1. Ингибирующее действие бортезомиба и сунитиниба на клеточных линиях MDA-MB-231 и SKBR-3

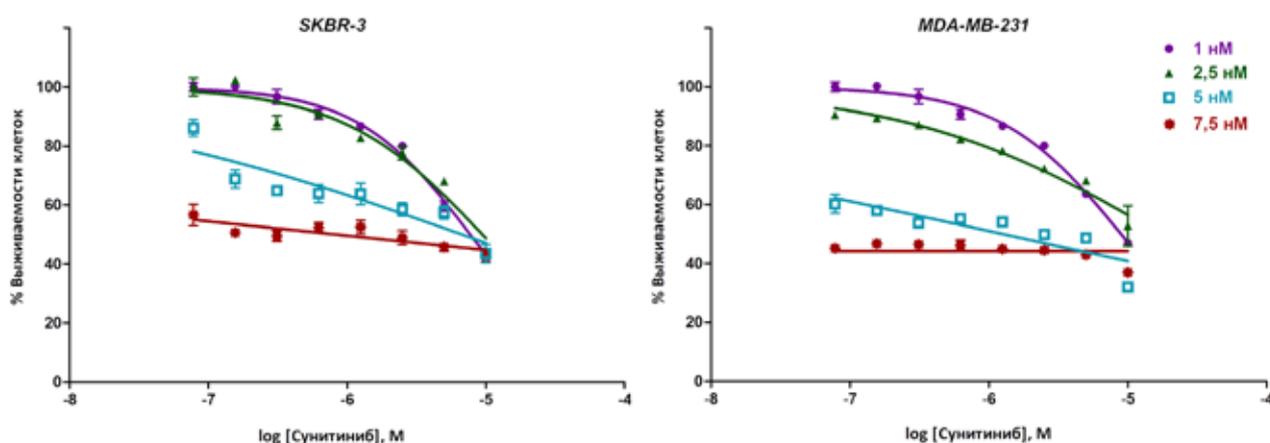


Рис.2. Комбинированная терапия на клеточных линиях SKBR-3 и MDA-MB-231 in vitro

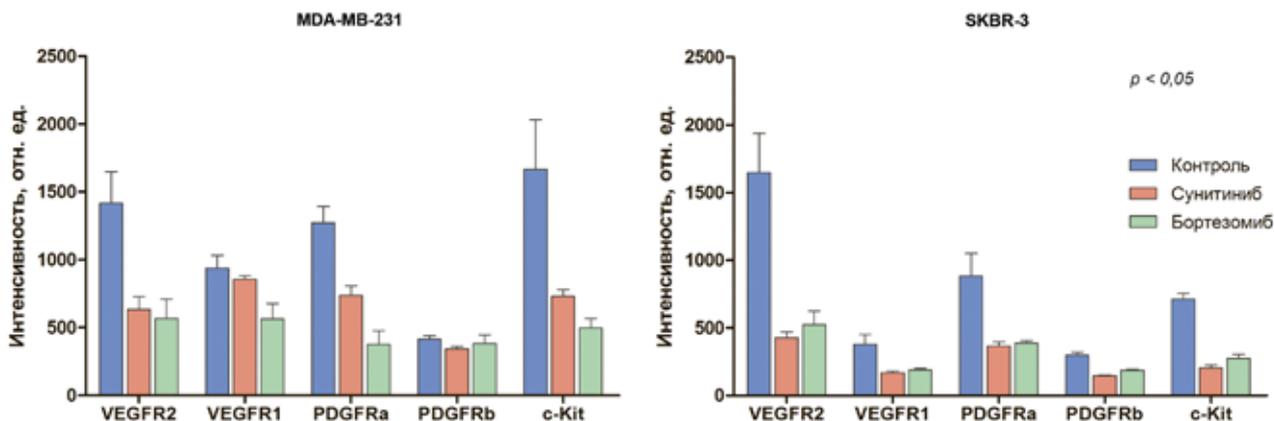


Рис.3. Экспрессия молекулярных маркеров в образцах клеточных линий MDA-MB-231 и SKBR-3 ($p < 0,05$ по отношению к контрольной группе)

7,5 нМ усиливает цитотоксичность сунитиниба для линии SK-BR-3. В то же время, бортезомиб в более низких концентрациях 1–2,5 нМ не вызывает выраженного изменения цитотоксичности сунитиниба на обеих клеточных линиях РМЖ. Следует отметить, что концентрации бортезомиба 5–7,5 нМ, не проявляющие токсичность, вызывают гибель клеток при комбинировании с

сунитинибом. Таким образом, бортезомиб является более сильным цитотоксическим ингибитором, который может потенцировать действие сунитиниба при применении в концентрации 5–7,5 нМ in vitro. Сходные результаты были получены при комбинированном применении бортезомиба с цисплатином и 5-фторурацилом на клеточной линии РМЖ 4Т1 [15].

Изучение экспрессии рецепторных тирозинкиназ клетками линий SKBR-3 и MDA-MB-231 под действием бортезомиба и сунитиниба было проведено при помощи иммуноцитохимического окрашивания с антителами к VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , PDGFR β и c-Kit. Результаты эксперимента представлены на рис.3.

Иммуноцитохимическое исследование показало, что обе линии РМЖ в достаточной степени экспрессируют рецепторные тирозинкиназы. Обе линии имеют схожую высокую экспрессию VEGFR2, но линия MDA-MB-231 отличается более выраженной экспрессией рецепторов PDGFR α и c-Kit в сравнении с клеточной линией SKBR-3. Наименьшая экспрессия наблюдалась для рецептора PDGFR β на обеих линиях. При изучении действия сунитиниба на рецепторы тирозинкиназ концентрация сунитиниба равнялась 1 мкМ, длительность инкубации - 24 часа. Согласно полученным данным, под действием данного препарата значительно снижалась экспрессия маркеров VEGFR2, PDGFR α , а также c-Kit; экспрессия VEGFR-1 незначительно снижалась в клеточной линии SKBR-3. Таким образом, сунитиниб в нецитотоксической концентрации вызывает снижение экспрессии рецепторных тирозинкиназ. Аналогичное действие сунитиниба на экспрессию VEGFR1 и VEGFR2 было показано на клеточных линиях плоскоклеточного рака головы и шеи [2].

Бортезомиб в концентрации 7,5нМ вызвал значительное снижение экспрессии всех исследуемых рецепторов, что может быть связано с ингибированием действия протеасомы 26S, регулирующей внутриклеточный обмен белков. Так, показано, что экспрессия рецепторов к эстрогенам зависит от активности протеасомы 26S, и при длительном применении бортезомиба препарат вызывает снижение экспрессии ER α у нескольких клеточных линий рака молочной железы: MCF7, T47D, BT474 [10].

Выводы

Настоящее исследование, проведенное на HER2- и HER2+ клеточных линиях РМЖ, показало что бортезомиб в нецитотоксических концентрациях потенцирует действие сунитиниба, причем клеточная линия MDA-MB-231 проявила большую чувствительность к комбинации бортезомиба и сунитиниба *in vitro*. Бортезомиб и сунитиниб вызывают снижение экспрессии рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , PDGFR β и c-Kit.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00528)

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – Vol. 4. – P. 349–360.
2. Aderhold, C., Faber A., Umbreit C. et al. Small molecules alter VEGFR and PTEN expression in HPV-positive and -negative SCC: new hope for targeted-therapy // Anticancer Res. – 2015. – Vol. 35. – P.1389–1399.
3. Banerjee S., Dowsett M., Ashworth A., and Martin L.-A. Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer // Nat. Clin. Pract. Oncol. – 2007. – Vol. 4. – P. 536–550.
4. Bergh J., Bondarenko I.M., Lichinitser M.R. et al. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study // J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2012. – Vol. 30. – P.921–929.
5. Crown J.P., Diéras V., Staroslawska E. et al. Phase III trial of sunitinib in combination with capecitabine versus capecitabine monotherapy for the treatment of patients with pretreated metastatic breast cancer // J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. – 2013. – Vol.31. – P.2870–2878.
6. Deshaies R.J. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy // BMC Biol. – 2004. – Vol.12. – P.94.
7. Feroni C., Broggin M., Generali D., and Damia, G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact // Cancer Treat. Rev. – 2012. – Vol.38. – P. 689–697.
8. Jansson S., Bendahl P.-O., Grabau D.A. et al. The three receptor tyrosine kinases c-KIT, VEGFR2 and PDGFR α , closely spaced at 4q12, show increased protein expression in triple-negative breast cancer // PLoS ONE. – 2014. – Vol.9. – e102176.
9. Mendel D.B., Laird A.D., Xin X. et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic / pharmacodynamic relationship // Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. – 2003. – Vol.9. – P.327–337.
10. Powers G.L., Rajbhandari P., Solodin N.M. et al. The Proteasome Inhibitor Bortezomib Induces an Inhibitory Chromatin Environment at a Distal Enhancer of the Estrogen Receptor- α Gene // PLoS ONE. – 2013. – Vol.8. – e81110.
11. Schmid P., Kühnhardt D., Kiewe P. et al. A phase I/II study of bortezomib and capecitabine in patients with metastatic breast cancer previously treated with taxanes and/or anthracyclines // Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO – 2008. – Vol.19. – P. 871–876.
12. Sorolla A., Yeramian A., Valls, J. et al. Blockade of NF κ B activity by Sunitinib increases cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells // Mol. Oncol. – 2012. – Vol.6. – P. 530–541.
13. Trinh X.B., Sas L., Van Laere S.J. et al. A phase II study of the combination of endocrine treatment and bortezomib in patients with endocrine-resistant metastatic breast cancer // Oncol. Rep. – 2012. – Vol.27. – P. 657–663.
14. Yeramian A., Sorolla A., Velasco A. et al. Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces

growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway // *Int. J. Cancer.* – 2012. – Vol.130. – P.967–978.

15. Yerlikaya A., Altıkat S., Irmak R. et al. Effect of bortezomib in combination with cisplatin and 5-fluorouracil on 4T1 breast cancer cells // *Mol. Med. Rep.* – 2013. – Vol.8. – P.277–281.

Поступила в редакцию 10.06.2016 г.

*Yu.A.Khochenkova, E.Sh.Solomko, O.O.Ryabaya,
E.V.Stepanova, D.A.Khochenkov*

Antitumor effect of sunitinib and bortezomib on breast cancer cell line in vitro

N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center
Moscow

The discovery for effective combinations of anticancer drugs for treatment for breast cancer is the actual problem in the experimental chemotherapy. In this paper we conducted a study of antitumor effect of the combination of sunitinib and bortezomib against MDA-MB-231 and SKBR-3 breast cancer cell lines in vitro. We found that bortezomib in non-toxic concentrations can potentiate the antitumor activity of sunitinib. MDA-MB-231 cell line has showed great sensitivity to the combination of bortezomib and sunitinib in vitro. Bortezomib and sunitinib caused reduced expression of receptor tyrosine kinases VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , PDGFR β and c-Kit on HER2⁻ and HER2⁺ breast cancer cell lines

Key words: breast cancer, sunitinib, bortezomib, combined therapy in vitro