УДК 616-006.04:57.08

О. М. Пясковська
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

АНТИАНГІОГЕННА ДІЯ ЦИКЛОФОСФАНУ ВІДНОСНО МЕТАСТАЗУЮЧИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН

Досліджено чутливість двох варіантів карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9), які відрізняються між собою за ангіогенним та метастатичним потенціалом, до дії циклофосфану в низькодозовому метрономному режимі введення. Встановлено, що низькометастазуючий варіант LLC/R9 мав високу чутливість до дії циклофосфану, що проявлялося значним інгібуванням росту первинної пухлини та суттєвим зниженням рівня метастатичного ураження легень, тоді як високометастазуючий варіант LLC був нечутливим до його дії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **карцинома легені Льюїс, циклофосфан, чутливість до протипухлинної антиангіогенної терапії.**

ВСТУП. Беручи до уваги високу залежність прогресії солідних злоякісних пухлин від пухлинного ангіогенезу, протипухлинна антиангіогенна терапія (ПАТ) досі не втрачає своєї привабливості та перспективності як концептуально нова стратегія лікування онкологічних хворих, кардинально відмінна від традиційної хіміотерапії. Ключовою відмінністю є перш за все зміна основної мішені дії (замість злоякісної клітини – ендотеліальна) та кінцевого результату терапії (замість спроби прямо знищити злоякісну пухлину – переведення хвороби у хронічний стан). Відповідно до складності та багатофакторності процесу пухлинного ангіогенезу за більше ніж 30 років стрімкого розвитку ПАТ було апробовано різноманітний арсенал протипухлинних засобів – від чисельних таргетних антиангіогенних засобів [7, 11] до використання класичних хіміотерапевтичних препаратів у метрономному низькодозовому режимі введення чи при їх поєднанні [11, 15]. Метрономна низькодозова хіміотерапія з'явилася як альтернативна або доповнювальна терапія до традиційної хіміотерапії. Метрономний низькодозовий режим введення класичних, добре відомих цитостатиків оптимально експлуатує їх антиангіогенні властивості. Той факт, що протипухлинний ефект низькодозової метрономної терапії деяких традиційних цитостатиків, у тому числі циклофосфану, опосередковується переважно через інгібування пухлинного ангіогенезу, було доведено в багатьох роботах та показано переконливу ефективність такого підходу [9, 11].

© О. М. Пясковська, 2012.

Однак, незважаючи на вагомі здобутки, проблема існуючої або виникаючої резистентності торкнулася і ПАТ. На сьогодні механізми її виникнення активно з'ясовують [5, 8, 14]. На заваді успішного використання ПАТ у клінічній практиці є відсутність адекватних експериментальних моделей, що уповільнює визначення біологічних властивостей пухлини, чутливої до ПАТ.

Раніше ми встановили, що два варіанти карциноми легені Льюїс, які мають різний ангіогенний та метастатичний потенціал, проявляють різну чутливість до дії аконітиновмісного рослинного екстракту, для якого показано антиангіогенний механізм протипухлинної дії [3, 10]. Метою даної роботи було перевірити ефективність антиангіогенної терапії циклофосфаном (низькодозовий метрономний режим) відносно цих двох пухлинних моделей.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на мишах лінії C57Bl/6 віком 2–2,5 міс., масою 18–23 г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) імені Р. Є. Кавецького НАН України. Всі експерименти на тваринах виконували відповідно до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та дотримуючись правил роботи з лабораторними тваринами.

В роботі було використано два варіанти клітин карциноми легені Льюїс, одержаних з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР імені Р. Є. Кавецького НАН України: LLC – вихідний варіант, LLC/R9 – мо-

дифікований варіант, отриманий у результаті експериментальної прогресії *in vivo* в напрямку формування лікарської резистентності до протипухлинного препарату "Цисплатин" [6, 13].

Для проведення дослідів *in vivo* клітини LLC та LLC/R9 нарощували *in vitro* у поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС) (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37 °С у вологих умовах, 5 % CO_2 та інокулювали мишам внутрішньом'язово у кількості $1x10^6$ клітин в 0,1 мл розчину Хенкса.

Протипухлинну та антиметастатичну ефективність циклофосфану в низькодозовому метрономному режимі введення оцінювали на 24 добу після перещеплення пухлин. Для цього мишам з LLC (група 1) та LLC/R9 (група 2) вводили циклофосфан *per os* раз на добу протягом 15 діб у сумарній дозі 200 мг/кг маси тварин. Контролем слугували миші з LLC (контроль 1) та LLC/R9 (контроль 2), яким у такому ж об'ємі та за тією ж схемою вводили воду.

Для оцінки протипухлинної дії циклофосфану у тварин всіх піддослідних груп за рутинною методикою вимірювали розміри первинної пухлини та розраховували її об'єм. Щоб оцінити антиметастатичну дію циклофосфану в мишей, візуально визначали кількість та розмір метастазів у легенях і за загальноприйнятою методикою розраховували загальний об'єм метастатичного ураження легень.

Рівень фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF) у сироватці крові експериментальних тварин визначали за допомогою імуноферментного аналізу, використовуючи набір реагентів для визначення мишачого VEGF (R&D Systems, Англія) згідно з протоколом виробника. Сироватку крові для аналізу одержували рутинним методом не менше ніж з 5 тварин/групу.

Визначення рівня апоптозу в пухлинах оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії згідно з [4]. Для цього клітини, одержані шляхом механічної деградації з тканини пухлин на 24 добу після перещеплення, ресуспендували в гіпотонічному лізуючому буфері (0,1 % цитрат натрію, 0,1 % тритон Х-100), який містив 5 мкг/мл йодистого пропідію, та аналізували вміст ДНК на проточному цитофлуориметрі при довжині хвилі аргонового лазера 488 нм. Рівень апоптозу оцінювали за кількістю клітин (у %) з гіподиплоїдним вмістом ДНК в перерахунку на 10^4 клітин. Тканину пухлин для аналізу вилучали не менше ніж з 5 тварин/групу.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті дослідження ефективності циклофосфану відносно LLC та LLC/R9 в режимі антиангіогенної терапії було встановлено, що їх чутливість суттєво відрізняється: варіант LLC є нечутливим до дії циклофосфану, тоді як варіант LLC/R9 проявляє високу чутливість до його дії. Висока чутливість LLC/R9 до дії циклофосфану підтверджувалася вираженим пригніченням росту первинної пухлини, а також високодостовірним зниженням рівня метастатичного ураження легень. Так, на 24 добу після перещеплення об'єм пухлини у мишей з LLC/R9, яким вводили циклофосфан, був майже на 50 % нижчим ($p<0,05$), ніж відповідний у контролі (табл. 1). Кількість метастазів у мишей з LLC/R9, яким вводили циклофосфан, була більше ніж втричі ($p<0,05$) меншою, а об'єм метастазів – на 85% ($p<0,05$) нижчим порівняно з відповідними показниками у контролі. Тоді як суттєвого впливу циклофосфану на ріст і метастазування LLC не було виявлено. Як видно з таблиці 1, показники росту і метастазування у мишей з LLC, які одержували циклофосфан, практично не відрізнялися від відповідних у контролі.

Висока протипухлинна ефективність циклофосфану відносно LLC/R9 реалізовувалася за рахунок індукції апоптозу в пухлині у результаті проведеної терапії. Так, рівень циклофосфаніндукованого апоптозу в пухлинах мишей з LLC/R9 був більше ніж вдвічі вищим порівняно з рівнем апоптозу в пухлинах контрольної групи ($p<0,05$, табл. 2). Згідно з [2], циклофосфан у режимі антиангіогенної терапії індукує апоптоз ендотеліальних клітин,

Таблиця 1 – **Вплив циклофосфану в метрономному режимі введення на ріст і метастазування LLC та LLC/R9**

Група тварин	Об'єм первинної пухлини, мм^3	Кількість метастазів	Об'єм метастазів, мм^3
LLC			
Група 1 (n=14)	963,6±143,0	40,4±6,3	111,4±28,1
Контроль 1 (n=14)	850,6±117,7	31,1±5,3	103,7±21,5
LLC/R9			
Група 2 (n=14)	845,3±146,0*	2,8±0,7*	6,2±2,2*
Контроль 2 (n=14)	1594,0±332,0	9,3±2,2	40,1±12,0

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – показник статистично достовірно ($p<0,05$) відрізняється від відповідного у контролі.

Таблиця 2 – **Вплив терапії циклофосфаном у метрономному режимі введення на рівень апоптозу в пухлинах LLC та LLC/R9**

Група тварин	Рівень апоптозу в пухлині, % від загальної кількості клітин
LLC	
Група 1	41,2±12,8
Контроль 1	31,6±4,8
LLC/R9	
Група 2	56,4±10,0*
Контроль 2	27,4±8,7

який передує апоптозу клітин пухлини. Очевидно, підвищення рівня апоптозу в LLC/R9 після терапії циклофосфаном можна розглядати не тільки як результат його прямої цитотоксичної/цитостатичної дії, але й як наслідок циклофосфаніндукованого апоптозу ендотеліальних клітин. У випадку LLC, на відміну від LLC/R9, суттєвого впливу циклофосфану на рівень апоптозу в пухлині не було встановлено. Так, кількість апоптотичних клітин у пухлинах мишей з LLC, яким проводили терапію циклофосфаном, статистично достовірно не відрізнялася від такої у відповідному контролі.

Значний протипухлинний та антиметастатичний ефект циклофосфану відносно LLC/R9 супроводжувався також зниженням рівня циркулюючого VEGF. Так, у сироватці крові мишей з LLC/R9, яким проводили терапію циклофосфаном, рівень VEGF на 24 добу після перещеплення пухлини був в 1,7 раза ($p<0,05$) меншим порівняно з таким у відповідному контролі (рис.). Оскільки головними продуцентами VEGF в організмі пухлиноносія є пухлинні клітини, зниження його рівня в сироватці крові мишей з LLC/R9, яким проводили терапію циклофосфаном, можна розглядати і як результат значного зменшення об'єму первинної пухлини. Разом із тим, рівень VEGF у сироватці крові мишей з LLC, яким проводили терапію циклофосфаном, статистично достовірно не відрізнявся від такого у відповідному контролі.

Отже, одержані дані свідчать про те, що варіант LLC/R9, на відміну від LLC, мав високу чутливість до дії циклофосфану в разі його введення у режимі антиангіогенної терапії, що проявлялося значним інгібуванням росту первинної пухлини та суттєвим зниженням рівня метастатичного ураження легень. З попередніх досліджень відомо, що варіант LLC/R9 за своїми біологічними властивостями суттєво відрізняється від варіанта LLC. Однією з головних особливостей варіанта LLC/R9 є його високий ангіогенний потенціал. Зокрема, рівень продукування VEGF клітинами LLC/R9 *in vitro* значно більший, ніж клітинами LLC [6]. Незважаючи на високий ангіогенний потенціал, варіант LLC/R9, порівняно з LLC, характеризується низьким метастатичним потенціалом. Як видно з таблиці 1, кількість та загальний об'єм метастатичного ураження легень у мишей з LLC/R9 втричі ($p<0,05$) нижчі, ніж у тварин з LLC.

Раніше ми показали, що LLC/R9, на відміну від LLC, проявляє високу чутливість і до аконітиновмісного рослинного екстракту, для якого показано антиангіогенний механізм дії

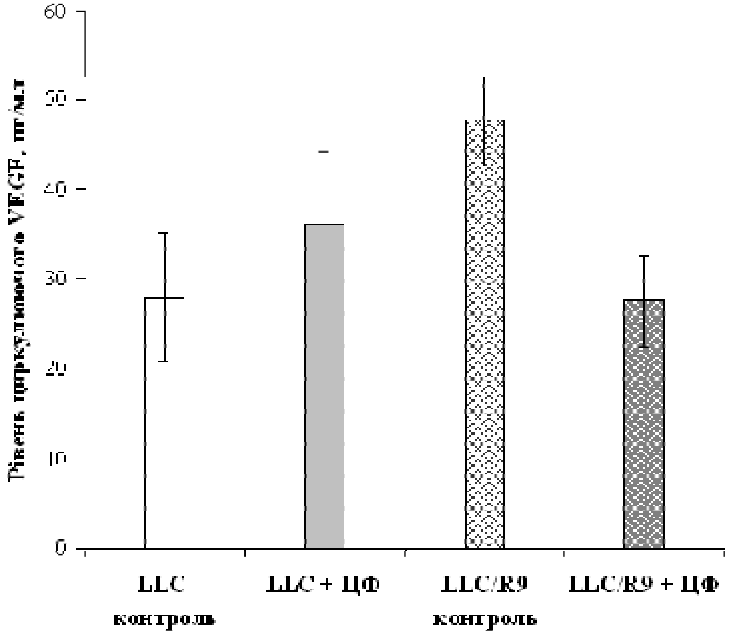

Рис. Вплив циклофосфану в метрономному режимі введення на рівень циркулюючого VEGF у мишей з LLC та LLC/R9 на 24 добу після перещеплення пухлини (ЦФ – циклофосфан).

[3, 10]. Як і у випадку циклофосфану в метрономному режимі введення, аконітиновмісний екстракт призводив до вираженого інгібування росту та метастазування LLC/R9 і суттєво не впливав на ріст та метастазування LLC. Той факт, що варіанти пухлин одного генезу мають різну чутливість до ПАТ, вказує на те, що її ефективність значною мірою визначається біологічними властивостями пухлини. Безперечно, останнє включає в себе як наслідки взаємодії пухлини з організмом хазяїна, так і біологічні властивості власне пухлинних клітин та їх адаптивні можливості у відповідь на антиангіогенну терапію [8]. Зокрема, в роботі [1] було показано, що клітини LLC є толерантними до метаболічного стресу, спричиненого їх довготривалою інкубацією без заміни поживного середовища, що моделює дефіцит поживних субстратів, який виникає внаслідок ефективної дії ПАТ. У будь-якому випадку, беручи до уваги високу чутливість LLC/R9 до інгібування пухлинного ангіогенезу агентами з різним механізмом дії, високу ефективність ПАТ, очевидно, можна очікувати відносно пухлин з високим ангіогенним потенціалом та/або низькою метастатичною активністю.

ВИСНОВКИ. 1. За допомогою двох метастазуючих варіантів експериментальних пухлин одного генезу показано зв'язок між ефективністю циклофосфану в низькодозовому метрономному режимі введення та ангіогенним і метастатичним потенціалом пухлини.

2. Високий ангіогенний та низький метастатичний потенціал LLC/R9 корелює з високою чутливістю до дії ПАТ, тоді як низький ангіогенний та високий метастатичний потенціал LLC асоціюється з резистентністю до її дії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture / O. N. Pyaskovskaya, D. L. Kolesnik, A. V. Kolobov [et al.] // Exp. Oncol. – 2008. – **30**, № 4. – P. 269–275.

2. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer / T. Browder, C. E. Butterfield, B. M. Kraling [et al.] // Cancer Res. – 2000. – **60**. – P. 1878–1886.

3. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 / G. I. Solyanik, A. G. Fedorchuk, O. N. Pyaskovskaya [et al.] // Exp. Oncol. – 2004. – **26**, № 4. – P. 307–311.

4. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry / I. Nicoletti, G. Migliorati, M. C. Pagliacci [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1991. – **139**. – P. 271–279.

5. Bergers G. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy / G. Bergers, D. Hanahan // Nat. Rev. Cancer. – 2008. – **8**. – P. 592–603.

6. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O. N. Pyaskovskaya, O. I. Dasyukevich, D. L. Kolesnik [et al.] // Exp. Oncol. – 2007. – **29**, № 3. – P. 197–202.

7. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer / N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, W. Novotny // Nat. Rev. Drug Discov. – 2004. – **3**, № 5. – P. 391–400.

8. Ebos J. M. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy / J. M. Ebos, C. R. Lee, R. S. Kerbel // Clin. Cancer Res. – 2009. – **15**, № 16. – P. 5020–5025.

9. Impact of metronomic UFT/cyclophosphamide chemotherapy and antiangiogenic drug assessed in a new preclinical model of locally advanced orthotopic hepatocellular carcinoma / T. C. Tang, S. Man, C. R. Lee [et al.] // Neoplasia. – 2010. – **12**. – P. 264–274.

10. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells / L. V. Garmanchouk, O. N. Pyaskovskaya, Yu. V. Yahish [et al.]// Exp.Oncology. – 2005. – **27**, № 4. – P. 262–266.

11. Kerbel R. S. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy / R. S. Kerbel, B. A. Kamen // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – **4**, № 6. – P. 423–436.

12. Kerbel R. S. Tumor angiogenesis / R. S. Kerbel // N. Engl. J. Med. – 2008. – **358**. – P. 2039–2049.

13. Solyanik G. I. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion / G. I. Solyanik, O. N. Pyaskovskaya, L. V. Garmanchouk // Exp. Oncol. – 2003. – **24**, № 4. – P. 260–265.

14. Strategies for delaying or treating in vivo acquired resistance to trastuzumab in human breast cancer xenografts / J. M. du Manoir, G. Francia, S. Man [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2006. – **12**, № 3, Pt 1. – P. 904–916.

15. Tumors that acquire resistance to low-dose metronomic cyclophosphamide retain sensitivity to maximum tolerated dose cyclophosphamide / U. Emmenegger, G. Francia, A. Chow [et al.] // Neoplasia. – 2011. – **13**, № 1. – P. 40–48.

О. Н. Пясковская
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ ИМЕНИ Р. Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

АНТИАНГИОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИКЛОФОСФАНА В ОТНОШЕНИИ МЕТАСТАЗИРУЮЩИХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Резюме

Исследована чувствительность двух вариантов карциномы легкого Льюис (LLC и LLC/R9), отличающихся ангиогенным и метастатическим потенциалом, к действию циклофосфана в низкодозовом метрономном режиме введения. Установлено, что низкометастазирующий вариант LLC/R9 проявлял высокую чувствительность к действию циклофосфана, что выражалось в значительном угнетении роста первичной опухоли и существенном снижении уровня метастатического поражения легких, тогда как высокометастазирующий вариант LLC оказался нечувствительным к его действию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **карцинома легкого Льюис, циклофосфан, чувствительность к противоопухолевой антиангиогенной терапии.**

O. M. Pyaskovska
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

ANTIANGIOGENIC ACTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE TO EXPERIMENTAL METASTATIC TUMORS

Summary

It was studied sensibility of two Lewis lung carcinoma variants (LLC та LLC/R9) with different angiogenic and metastatic potential to action of cyclophosphamide administered in low-dose metronomic regimen. It was established that LLC/R9, low-metastatic variant, showed high sensitivity to action of cyclophosphamide, that was expressed in considerable inhibition of a primary tumor growth and essential decrease in level of metastatic spread in lung, whereas LLC, high-metastatic variant, did not show sensitivity to its action.

KEY WORDS: **Lewis lung carcinoma, cyclophosphamide, sensitivity to antitumor antiangiogenic therapy.**

Отримано 03.11.11

Адреса для листування: *О. М. Пясковська, Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, e-mail: pyaskovskaya@gmail.com*