

SKIRTINGŲ KRŪTIES VĖŽIO LĄSTELIŲ LINIJŲ ATSPARUMO RADIOTERAPIJAI TYRIMAS

Danguolė Laukaitienė¹, Antanas Vaitkus², Aistė Savukaitytė¹, Roberta Vadeikienė¹,
Arturas Inčiūra¹, Rasa Ugenskienė¹, Elona Juozaitytė¹

¹Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Onkologijos institutas,

²Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Radiologijos klinika

Raktažodžiai: krūties vėžys, atsparumas, radioterapija, apoptozė, ląstelės ciklas.

Santrauka

Įvadas. Radioterapija yra vienas iš pagrindinių vėžio gydymo metodų, taikomų daugiau kaip pusei onkologinių pacientų. Manoma, kad pagrindinė onkologinės ligos pasikartojimo ir nesėkmingo gydymo priežastis yra vėžinių ląstelių atsparumas radioterapijai. Viena iš pagrindinių atsparumo radioterapijai priežasčių yra vėžinių ląstelių gebėjimas išvengti apoptozės. Manoma, kad ląstelės ciklas taip pat yra vienas iš procesų, turinčių reikšmės radioatsparumui. Šio tyrimo tikslas – įvertinti skirtingų krūties vėžio ląstelių linijų atsparumą radioterapijai, lyginant jų gyvybingumą, ląstelių pasiskirstymą tarp ciklo fazių ir apoptozės intensyvumą. Metodika. MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas buvo iširtas, naudojant kolonijų formavimo testą. Ląstelės ciklo analizei buvo dažomos propidžio jodidu ir analizuojamos, naudojant tėkmės citometrą *Muse Cell Analyzer*. Apoptozės intensyvumui nustatyti naudotas aneksinas V ir *Guava PCA* tėkmės citometras. Rezultatai. Šiame tyrime nustatėme, kad MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumas po radioterapijos poveikio buvo didesnis, nei MCF-7 ląstelių. Ciklo analizė parodė, kad po radioterapijos poveikio MCF-7 ląstelių ciklo sustabdymas vyko G0/G1 fazėje, o MDA-MB-231 ląstelių – G2/M fazėje. Po radioterapijos poveikio MCF-7 ląstelėse apoptozė prasidėjo anksčiau ir buvo intensyvesnė, o MDA-MB-231 ląstelės reagavo vėliau ir turėjo uždelstą apoptozinį atsaką. Išvados. MDA-MB-231 ląstelės buvo atsparesnės radioterapijai, negu MCF-7 ląstelės.

Įvadas

Krūties vėžys yra dažniausia onkologinė moterų liga ne tik Lietuvoje, bet ir daugelyje išsivysčiusių pasaulio šalių. Vien per 2020 metus pasaulyje nustatyta apie 2,3 milijono naujų

krūties vėžio atvejų. Nuo šio vėžio kasmet miršta daugiau kaip pusė milijono pacientų ir tai yra penkta pagal mirtinumą vėžio forma. Šie skaičiai atspindi krūties vėžio paplitimo dydį, prevencinių bei terapinių priemonių plėtojimo poreikį [1].

Krūties vėžys yra labai heterogeniška liga, turinti platų klinikinių, pataloginių bei molekulinį savybių spektrą ir klasifikuojama į keletą biologinių potipių [2]. Ši klasifikacija paremta imunohistocheminiu tyrimu nustatius estrogenų (ER), progesteronų (PR), EGFR receptorių Her2 (HER2) ir Ki67 statusą vėžio ląstelėse. Šie krūties vėžio potipiai pasižymi skirtingais rizikos veiksniais, naviko charakteristikomis bei atsaku į gydymą. Navikai, kuriuose nustatomi estrogenų ir progesteronų receptoriai yra susiję su geresne ligos prognoze ir geru atsaku į hormonų terapiją. Navikai su padidėjusia HER2 raiška yra blogesnės prognozės, daug piktybiškesni ir juos reikia intensyviau gydyti. Blogiausia prognoze pasižymi trigubai neigiamas potipis, išsiskiriantis savo biologinėmis savybėmis, agresyviu augimu, metastazavimo savitumais ir dažnesniu ligos atkryčiu [3,4]. Šių potipių klasifikavimas yra didelis laimėjimas gydant krūties vėžį ir tai yra pagrindas sisteminei terapijai parinkti. Įrodyta, kad atsakas į chemoterapiją priklauso nuo krūties vėžio potipių, tačiau mažai žinoma apie jų atsaką į spindulinį gydymą [5]. Manoma, kad radioterapijos poveikis skirtingiems ligos potipiams gali būti nevienodas ir siejamas su ląstelių radiojautrumo ir radioatsparumo savybėmis [6].

Radioterapija yra vienas iš pagrindinių kompleksinio vėžio gydymo metodų, taikomų daugiau kaip pusei onkologinių pacientų. Užkirsdama kelią lokaliai ligos atkryčiui, radioterapija padeda sumažinti tolimųjų metastazių ir mirtinumą dažnį [7]. Nors radioterapija yra efektyvus krūties vėžio gydymo metodas, tačiau ne visiems pacientams veiksmingas. Ligos atsinaujinimas rodo nevisišką vėžio ląstelių išnaikinimą ir (ar) įgytą atsparumą gydymui [8]. Nors su radioatsparumu susiję molekuliniai mechanizmai plačiai tyrinėjami, tačiau nėra galutinai suprasti [9].

Po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio ląstelės inte-

gralumo palaikyme dalyvauja daug svarbių procesų. Vienas jų – ląstelės ciklo reguliacija, aktyvinanti DNR pažaidų patikros taškus. Kaip atsakas į genotoksinius veiksmus, šie patikros taškai sustabdo ląstelės ciklą ir duoda laiko ląstelių reparacijai arba inicijuoja ląstelės mirtį [10]. Radioterapijos tikslas – sukelti dvigubus DNR grandinės trūkius vėžinėse ląstelėse, nuslopinti pažaidų atitaisymo mechanizmus, siekiant paskatinti ląstelės ciklo sustabdymą ir apoptozę [6]. Manoma, kad vėžinės ląstelės gali turėti defektyvius ląstelės ciklo patikros taškus, kurie leidžia dalytis, išvengiant pažaidų atitaisymo. Taip vėžinės ląstelės gali išvengti apoptozės [11], o tai yra viena iš pagrindinių atsparumo radioterapijai priežasčių. Apoptozė yra labai svarbi fiziologinio balanso palaikymui tarp ląstelės augimo ir mirties. Dauguma priešvėžinių terapijų nukreipta į apoptozę ir su ja susijusius signalinius kelius piktybinių ląstelių pašalinimui [12]. Vėžinės ląstelės dažnai geba išvengti mirtį sukeliančios apoptozės dėl išsiregulavusių apoptozinių signalų, tokių kaip antiapoptozinės sistemos aktyvacija, kaspažių ir jų inhibitorių funkcijų sutrikimo, mirties receptorių signalų susilpnėjimo, p53 geno mutacijų ir kt. [13]. Toks vėžio ląstelių apoptozės išvengimas gali sukelti nekontroliuojamą proliferaciją, skatinti naviko išgyvenimą, įgyjant atsparumą ar sukeldami ligos atsinaujinimą [12].

Tyrimo tikslas – įvertinti skirtingų krūties vėžio ląstelių linijų atsparumą radioterapijai, lyginant jų gyvybingumą, ląstelių pasiskirstymą tarp ciklo fazių ir apoptozės intensyvumą.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Ląstelių linijos ir auginimo sąlygos. MCF-7 ir MDA-MB-231 krūties vėžio ląstelės buvo nupirktos iš *CLS Cell Line Service* (Vokietija). Visos ląstelės buvo auginamos DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich*) augimo terpėje, papildytoje 10 % fetaliniu jaučio serumu (*FBS, Gibco*), 1% L-glutaminu (*Gibco*) ir 100 IU/ml penicilino-streptomicino antibiotikų (*Gibco*). Ląstelės auginamos 25 cm² flakonėliuose su 5 ml augimo terpės ir laikomos inkubatoriuje, kuriame palaikoma reikalinga 37 °C temperatūra, drėgnumas ir 5% CO₂ prisotinta aplinka. Ląstelių atkėlimui buvo naudojamas tripsino/EDTA tirpalas (*Gibco*).

Kolonijų formavimo testas. MCF-7 ir MDA-MB-231 krūties vėžio ląstelės buvo pasėtos skirtingais kiekiais į 6 šulinėlių lėkšteles ir paliktos per naktį, kad prisitvirtintų prie lėkštelės dugno. Po to ląstelės buvo apšvitintos 2, 4, 6, 8 ir 10 Gy jonizuojančiosios 6 MV fotoninės spinduliuotės dozėmis, naudojant spindulinės terapijos linijinį greitintuvą *Clinac 2100C/D*. Kontrolinės grupės ląstelės buvo nešvitintos. Visos lėkštelės su ląstelėmis buvo laikomos dvi savaites 37 °C temperatūroje. Susiformavusios kolonijos buvo fiksuojamos 96% etanoliu, dažomos 1% kristalo violeto (*Merck KGaA, Vokietija*) dažais, plaunamos vandeniu ir išdžiovinamos. Kolonijos

skaičiuojamos naudojant šviesinį mikroskopą. Tikra kolonija laikoma tokia, kuri susideda iš mažiausiai 50 ląstelių. Ląstelių išgyvenamumas apskaičiuotas dalijant kolonijų skaičių iš pasėtų ląstelių skaičiaus ir dauginant iš sėjimo efektyvumo. Iš viso buvo atlikti trys nepriklausomi eksperimentai.

Ląstelės ciklo analizė. MCF-7 ir MDA-MB-231 krūties vėžio ląstelės buvo pasėtos į 6 šulinėlių lėkšteles. Po 24 val. ląstelės buvo apšvitintos 2, 4, 6, 8 ir 10 Gy jonizuojančiosios spinduliuotės dozėmis ir inkubuotos 24, 48 ir 72 valandas. Kontrolinės ląstelių grupės buvo nešvitintos. Atkeltos ląstelės dukart plaunamos su 1xPBS ir fiksuojamos 70% lediniame etanolyje. Laikomos per naktį -20 °C temperatūroje. Toliau vėl plaunamos su 1xPBS ir dažomos propidžio jodidu, naudojant *Muse Cell Cycle Kit* rinkinį. Ląstelės ciklo pasiskirstymas buvo analizuojamas tėkmės citometru *Muse Cell Analyzer (Millipore, Billerica, MA, USA)*.

Apoptozės analizė. MCF-7 ir MDA-MB-231 krūties vėžio ląstelės buvo pasėtos į 25 cm² flakonėlius ir po 24 val. apšvitinamos 2, 4, 6, 8 ir 10 Gy jonizuojančiosios spinduliuotės dozėmis. Kontrolinės grupės ląstelės nešvitintos. Po radioterapijos poveikio praėjus 24, 48 ir 72 val., ląstelės buvo pakeltos nuo lėkštelės dugno ir dažomos aneksinu V, naudojant *Flow Collect MitoDamage Kit* reagentų rinkinį. Apoptozės intensyvumui nustatyti buvo naudotas tėkmės citometras *Guava PCA*.

Statistinė duomenų analizė. Visi eksperimentai pakartoti mažiausiai 3 kartus. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant SPSS 20 (*IBM SPSS Inc., Chicago, IL*) programą, taikant Student t kriterijų. Kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$, tuomet skirtumas tarp dviejų imčių ar jų grupių laikytas statistiškai reikšmingu.

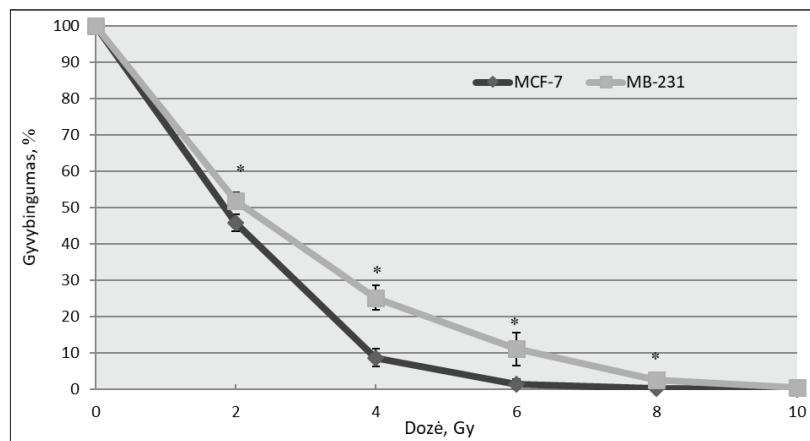
Tyrimo rezultatai

Kolonijų formavimo testas. Po radioterapijos poveikio MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių gyvybingumui palyginti buvo pasirinktas kolonijų formavimo testas. Mūsų rezultatai parodė, kad po poveikio 2 Gy doze abiejų linijų ląstelių gyvybingumas ženkliai sumažėjo: MCF-7 ląstelių 45,84% ±2,24, o MDA-MB-231 – 51,9% ±2,27. Po 4 Gy dozės kolonijas formavo tik 8,76% ±2,43 MCF-7 linijos ląstelių, o MDA-MB-231 – 22,27% ±7,22. Reikšmingas skirtumas tarp linijų buvo ir po 6 Gy dozės: 1,53% ±1,2 ir 9,42% ±5,48 atitinkamai MCF-7 ir MDA-MB-231. Po 8 ir 10 Gy MCF-7 ląstelės beveik visai neformavo kolonijų (atitinkamai 0,23% ±0,19; 0,01% ±0,026), buvo randama viena kolonija arba visai nerandama. MDA-MB-231 linijos ląstelės po 8 Gy dozės kolonijas formavo 2,64% ±0,66 ląstelių, o po 10 Gy buvo randama iki 4 kolonijų lėkštelėje (0,47% ±0,4). Remiantis gautais duomenimis, galima teigti, kad MDA-MB-231 ląstelės buvo atsparesnės radioterapijos poveikiui nei MCF-7 ląstelės (1 pav.).

Ląstelės ciklo analizė. Atlikome MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių ciklo analizę po radioterapijos poveikio. Kaip rodo mūsų rezultatai, po 24 val. MCF-7 ląstelės liko G0/G1 fazėje ir reikšmingai nekito, didėjant radioterapijos dozėms. S fazėje matomas ląstelių sumažėjimas didėjant spindulinės terapijos dozėms, o G2/M fazėje nežymus padėjimas tik esant 8 ir 10 Gy. Po 48 valandų nustatytas nežymus ląstelių kiekio didėjimas G0/G1 fazėje, o po 72 val. pastebėtas grįžimas prie 24 val. poveikio reikšmių (2 pav.). Panaši tendencija nustatyta ir kitose ciklo fazėse, kai praėjus 72 valandoms, ląstelių ciklas normalizuojasi. Manoma, kad po radioterapijos poveikio MCF-7 ląstelių ciklas galėjo būti laikinai sustabdytas G0/G1 fazėje ir po 72 val. grįžti į normalų ląstelės ciklą. Visiškai kitokius rezultatus parodė MDA-MB-231 ląstelių ciklo analizė, praėjus 24 valandoms po radioterapijos poveikio. Kaip matyti 3 pav., 4, 6, 8 ir 10 Gy dozės poveikio taškuose ląstelių kiekiai sumažėjo G0/G1 ir žymiai padidėjo G2/M

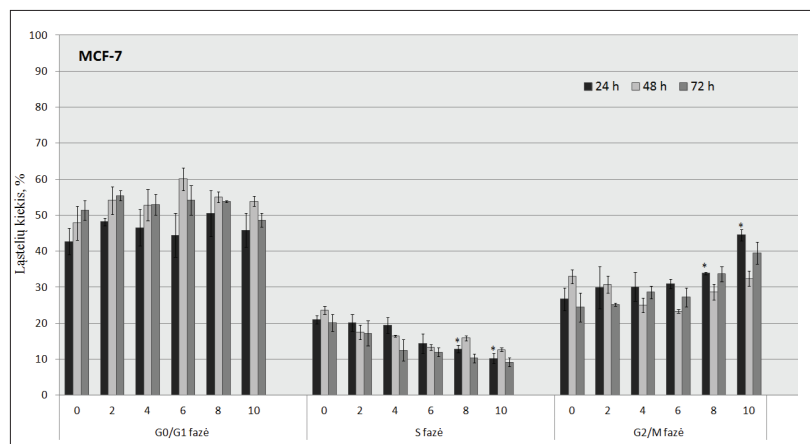
fazėje, tačiau jau po 48 val. stebimas ląstelių sugrįžimas į savo pradinę ciklo būseną, t.y. ląstelių kiekiai radioterapijos paveiktose grupėse artėja prie kontrolinių grupių reikšmių, kai G0/G1 fazėje ląstelių kiekiai didėja, o G2/M – mažėja. Tą patvirtina ir rezultatai, gauti po 72 valandų poveikio, nes jų reikšmės labai priartėja prie kontrolinės grupės reikšmių. Vadinas, po radioterapijos poveikio MDA-MB-231 ląstelių ciklas buvo laikinai sustabdytas G2/M fazėje. Literatūroje sutinkama duomenų, kad kuo didesnė jonizuojančiosios spinduliuotės dozė, tuo ilgiau gali užtrukti ląstelės ciklo sustabdymas [14]. Tai atsispindi ir mūsų rezultatuose, kad po poveikio 2, 4, 6 Gy dozėmis ląstelėms reikėjo 48 valandų, o po poveikio 8 ir 10 Gy – 72 valandų sugrįžti į normalų ląstelės ciklą. MCF-7 ląstelėms taikytos radioterapijos dozės neturėjo reikšmės laikui, kurio reikėjo ląstelių ciklo normalizavimuisi.

Apoptozės analizė. Buvo atlikti apoptozės tyrimai, siekiant išsiaiškinti, ar mūsų tiriamų ląstelių atsakas į radioterapiją skirsis, vertinant ląstelių apoptozės intensyvumą. Mūsų rezultatai rodo, kad jau po 24 val. MCF-7 linijos apoptozinių ląstelių buvo po 8 ir 10 Gy dozių, o MDA-MB-231 ląstelės neparodė apoptozinio atsako į jonizuojančiąją spinduliuotę: nei prie vienos taikytos dozės apoptozinių ląstelių kiekis statistiškai reikšmingai nepadidėjo. Po 48 val. MCF-7 apoptozinių ląstelių buvo randama ir po 4 ir 6 Gy dozių poveikio, kai MDA-MB-231 linijos reikšmingas apoptozinių ląstelių kiekis nustatytas esant didžiausioms 8 ir 10 Gy dozėms. Po 72 val. apoptozinių MCF-7 ląstelių statistiškai reikšmingai buvo padidėję po visų taikytų radioterapijos dozių, o MDA-MB-231 – tik esant didesnėms 6, 8 ir 10 Gy dozėms (4 pav.). Lyginami abiejų tirtų ląstelių linijų apoptozės intensyvumą matome, kad MCF-7 ląstelėse apoptozė prasidėjo anksčiau ir buvo intensyvesnė, negu MDA-MB-231 ląstelėse. MDA-MB-231 ląstelės reagavo vėliau ir turėjo uždelstą apoptozinį atsaką po radioterapijos poveikio.



1 pav. MDA-MB-231 ir MCF-7 krūties vėžio ląstelių linijų gyvybingumo priklausomybė nuo radioterapijos dozių

Kiekvienas taškas yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis su standartiniu nuokrypiu. Žvaigždutė (*) rodo statistiškai reikšmingą vertę, lyginant tarp ląstelių linijų.



2 pav. MCF-7 ląstelių pasiskirstymas tarp ciklo fazių po 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy dozių radioterapijos poveikio

Kiekvienas taškas yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis su standartiniu nuokrypiu. Žvaigždutė (*) rodo statistiškai reikšmingą vertę, lyginant su kontroline.

Diskusija

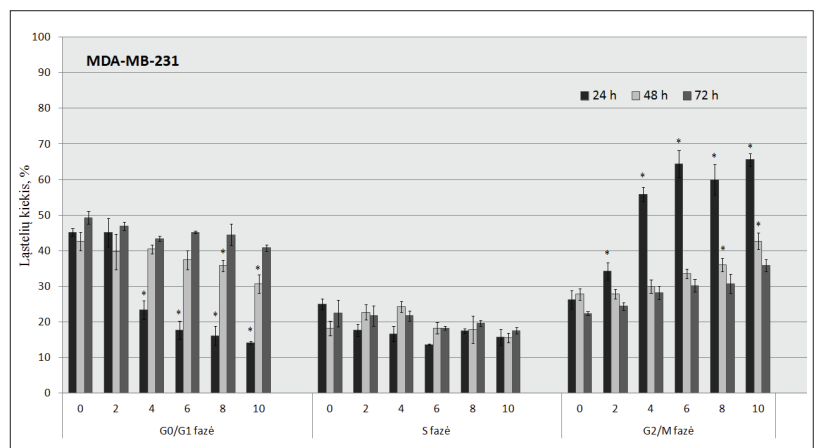
Šiam tyrimui buvo pasirinktos dvi skir-

tingus krūties vėžio potipius atitinkančios MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijos. MCF-7 yra neagresyvi, neinvazinė ir mažą potencialą metastazuoti turinti ląstelių linija. Šiai linijai būdinga estrogenų ir progesteronų receptorių raiška, todėl ji priskiriama luminaliniam A krūties vėžio potipiui [15]. MDA-MB-231 linijos ląstelės turi trejopai neigiamam potipiui būdingas charakteristikas. Šios ląstelės nepasižymi nei estrogenų, nei progesteronų, nei HER2 receptorių raiška ir yra labai agresyvi krūties vėžio forma [16]. Siekiant išsiaiškinti minėtų ląstelių atsaką į radioterapiją, buvo atlikti gyvybingumo, ląstelės ciklo ir apoptozės intensyvumo tyrimai.

Pirmiausia lyginome aukščiau aprašytų ląstelių linijų jautrumą radioterapijai. Naudojome kolonijų formavimo testą, kuris yra jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio ląstelėms tyrimų *in vitro* vertinimo auksinis standartas [17]. Gautų rezultatų analizė parodė, kad MDA-MB-231 ląstelių linijos išgyvenimas buvo didesnis esant visoms taikytos radioterapijos dozėms, o tai rodo didesnę MDA-MB-231 ląstelių atsparumą radioterapijai, lyginant su MCF-7 ląstelėmis. Šie mūsų duomenys sutapo su X. Chen ir kt. atliktų tyrimų rezultatais. Naudojami kolonijų formavimo testą, tyrėjai taip pat nustatė didesnę MDA-MB-231 ląstelių atsparumą radioterapijai, lyginant su MCF-7 ląstelėmis [18]. Skirtingą šių ląstelių linijų atsparumą jonizuojančiajai spinduliuotei pastebėjo ir Q. Zhang su kolegomis, švitindami ląsteles 2, 4 ir 8 Gy dozėmis [19]. Tokį skirtingą ląstelių atsaką į radioterapiją būtų galima paaiškinti remiantis jų skirtingais potipiais ir būdingoms charakteristikoms, tačiau mokslinėse publikacijose sutinkama ir prieštaringų rezultatų. F. Feng ir kt. tyrimuose su skirtingomis krūties vėžio ląstelių linijomis nenustatė reikšmingo skirtumo tarp krūties vėžio potipių ir jų atsako į radioterapiją [20]. Q. Zhang su kolegomis, tirdami metformino ir radioterapijos poveikį, nustatė, kad tik radioterapijos poveikyje esant 2, 4 ir 6 Gy dozėms šių ląstelių gyvybingumas reikšmingai nesiskyrė [21]. Šie prieštaringi tyrimų rezultatai gali atsirasti dėl skirtingų

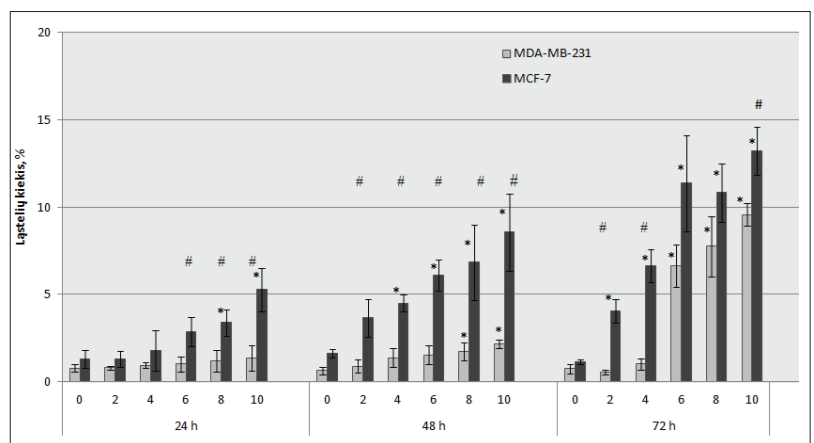
gyvybingumo testų metodikų, ląstelių apšvitinimo sąlygų ar naudotų ląstelių kokybės, todėl reikalingi tolesni ir išsamesni tyrimai MDA-MB-231 ląstelių radioatsparumui patvirtinti.

Ląstelių ciklo analizė po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio gali būti vienas iš metodų, nustatant ląstelių radiojautrumą [14], todėl buvo nuspręsta ištirti, ar ląstelių pasiskirstymas tarp ciklo fazių po radioterapijos poveikio skirsis tarp skirtingu radioatsparumu pasižyminčių MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių. Rezultatai parodė, kad radioterapijai jautresnių MCF-7 ląstelių ciklas galimai buvo sustabdytas G0/G1 fazėje, o didesniu atsparumu pasižymėjusios MDA-MB-231 ląstelės – G2/M fazėje. Šis skirtumas gali būti aiškinamas remiantis p53 geno statusu mūsų tiriamose ląstelėse. Literatūros duomenimis, MCF-7 ląstelėse p53 yra normaliai išreikštas [22], o MDA-MB-231 – mutuoatas [23]. P53 vadinamas „genomo sargybinu“ dėl savo savybės pajusti DNR pažeidi-



3 pav. MDA-MB-231 ląstelių pasiskirstymas tarp ciklo fazių po 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy dozių radioterapijos poveikio

Kiekvienas taškas yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis su standartiniu nuokrypiu. Žvaigždutė (*) rodo statistškai reikšmingą vertę, lyginant su kontrole.



4 pav. MDA-MB-231 ir MCF-7 apoptozinių ląstelių priklausomybė nuo radioterapijos dozių ir laiko

Kiekvienas taškas yra trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis su standartiniu nuokrypiu. Žvaigždutė (*) rodo statistškai reikšmingą vertę, lyginant su kontrole. grotelės (#) – statistškai reikšmingą vertę tarp ląstelių linijų.

mus ir skatinti šių pažeidimų ištaisymą. Po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio p53 baltymo kiekis padidėja, kaupiasi branduolyje ir sustabdoma baltymo degradacija [24]. Branduolyje veikdamas kaip transkripcijos faktorius, aktyvuotas p53 sukelia ląstelės ciklo sustabdymą G1 fazėje, o ląstelėse su DNR pažeidimais, kurie negali būti ištaisyti, p53 sukelia apoptozę [25]. Kadangi MCF-7 ląstelėse p53 išreikštas normaliai, galima manyti, kad šių ląstelių ciklo sustabdymą G0/G1 fazėje galėjo lemti radioterapijos sukelta p53 aktyvacija. Ląstelės, kuriose p53 yra mutuotas ar įvykusi jo delecija, gali išvengti p53 kontrolės ir ląstelės ciklo sustabdymo G0/G1 fazėje [25]. Tai galėtų būti vienas iš paaiškinimų, kodėl MDA-MB-231 ląstelių ciklas po radioterapijos buvo sustabdytas G2/M fazėje, o G0/G1 fazės buvo išvengta. Šiems teiginiams patvirtinti reikalingi išsamesni tyrimai.

MDA-MB-231 ląstelių ciklo sustabdymas G2/M fazėje gali būti siejamas su jų didesniu atsparumu radioterapijai. J. Li ir kt. savo publikacijoje teigia, kad vėžinių ląstelių kaupimasis po radioterapijos G2/M fazėje gali būti vienas iš veiksnų, dalyvaujančių įgyjant ląstelių radioatsparumą. Mūsų rezultatai sutapo su šia studija, kurioje buvo nustatyta, kad plaučių vėžio radioatspariose ląstelėse po radioterapijos poveikio praėjus 24 valandoms G2/M fazėje ląstelių kiekis buvo didesnis, lyginant su radiojautriomis ląstelėmis [26]. Panašus tyrimas buvo atliktas ir su mieloidinės leukemijos ląstelėmis, kur M. Hazawa su kolegomis nustatė, kad didėjant radioterapijos dozei, ženkliai padidėjo ir radioatsparių ląstelių kiekis G2/M fazėje [27]. Ch. Liu ir kt. savo tyrimais parodė, kad tiriant ląstelės ciklą galima įvertinti ląstelių atsparumą jonizuojančiajai spinduliuotei pagal susikaupusių ląstelių kiekį G2/M fazėje: kuo daugiau ląstelių G2/M fazėje, tuo didesnis radioatsparumas [14]. Jonizuojančiosios spinduliuotės poveikyje ląstelėse suaktyvinami ciklo kontrolės taškai, kurie leidžia laiku atlikti pažaidų atitaisymą arba negrįžtamai sustabdyti ciklą ir inicijuoti ląstelės mirtį. Žinant, kad homologinė rekombinacija vyksta S ir G2 fazėse, G2/M patikros taškai sustabdo ląstelės ciklą ir suteikia pakankamai laiko ląstelių pažaidų atitaisymui [28]. Paprastai visos ląstelės su nedideliais pažeidimais ir efektyvia reparacijos sistema po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio į normalų ciklą grįžta po 48 valandų [14]. DNR pažeidimai, kurių nepavyksta ištaisyti per 48 valandas, gali sukelti apoptozinių ląstelių skaičiaus padidėjimą po 72 valandų [28]. Tai glaudžiai siejasi su mūsų gautais MDA-MB-231 ląstelių apoptozės tyrimų rezultatais, kai po 72 valandų 6, 8 ir 10 Gy dozių poveikyje buvo reikšmingai padidėjęs apoptozinių ląstelių skaičius.

Lyginant ląstelių apoptozinį atsaką į radioterapiją, buvo nustatyta, kad MCF-7 ląstelėse apoptozė pasireiškė anksčiau ir buvo intensyvesnė, o MDA-MB-231 ląstelės reagavo vėliau ir apoptozinis atsakas buvo uždelstas. Mūsų duomenys sutapo

su Q. Zhang ir kt. gautais tyrimų rezultatais, kurie taip pat parodė, kad jonizuojančioji spinduliuotė sukelia didesnę apoptozės intensyvumą MCF-7 ląstelėms, negu MDA-MB-231 [19]. Manoma, kad padidėjęs ląstelių apoptozinis atsakas į radioterapiją rodo ląstelių didesnę radiojautrumą, todėl kai kurie mokslininkai apoptozės intensyvumą laiko vienu iš būdų vėžinių ląstelių radiojautrumui nustatyti [29]. Mūsų atlikta apoptozės tyrimo analizė parodė, kad MCF-7 ląstelės buvo jautresnės radioterapijai, negu MDA-MB-231 ir tai sutapo su mūsų gautais ląstelių gyvybingumo rezultatais.

MDA-MB-231 ląstelių radioatsparumas gali būti siejamas su viena iš vėžinėms ląstelėms būdingų savybių – slopinti ar išvengti apoptozės. Literatūroje aprašoma keletas už ląstelių išgyvenamumą atsakingų signalinių kelių, kurie aktyvinami po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio ir gali nuslopinti apoptozę, sumažinti radioterapijos citotoksiškumą bei padidinti vėžio ląstelių išgyvenamumą. Vienas tokių yra ERK1/2 signalinis kelias, kuris ląstelėje po radioterapijos poveikio aktyvinamas ir gali sukelti apoptozės sulaukymą, pagerinant antiapoptozinių baltymų, tokių kaip Bcl-xl, aktyvaciją ir nuslopinant proapoptozinių baltymų aktyvumą [30]. Kitas nemažiau svarbus ląstelių išgyvenamumo veiksnys yra AKT, kuris aktyvintas jonizuojančiosios spinduliuotės, neigiamai paveikia apoptozinius ląstelių kelius, leidžiant vėžio ląstelėms išlikti po radioterapijos poveikio. AKT gali veikti per keletą mechanizmų, tokių kaip pro-apoptozinių Bad, Bax, Bim ir Noxa baltymų slopinimas; NF-KB fosforilinimas, sukiant antiapoptozinių Bcl-2 ir Bcl-xl baltymų raišką; XIAP aktyvacija, dėl kurios slopinamos kaspazės 3, 7, 9; m-TOR kinazės signalinio kelio aktyvacija, kuri kartu sukelia ir antiapoptozinio baltymo MCL-1 aktyvaciją [31]. Jonizuojančioji spinduliuotė taip pat aktyvina JAK-STAT signalinį kelią, padidindama JAK-2 ir STAT fosforilinimą. STAT translokacija į ląstelės branduolį padidina Bcl2/Bcl-xl baltymų kiekį, todėl sumažėja kaspazės-3 aktyvumas. Šie procesai leidžia vėžinei ląstelei išgyventi po radioterapijos ir įgyti atsparumą [32]. Siekiant išsiaiškinti, kokie molekuliniai mechanizmai sukelia mūsų tiriamų MDA-MB-231 ląstelių radioatsparumą, reikia ištirti minėtų signalinių kelių svarbiausias signalines molekules ar baltymus ir įvertinti jų reikšmę, slopinant ląstelių apoptozę.

Ištyrę MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių atsaką į radioterapiją nustatėme, kad šios skirtingiems molekuliniais potipiems priskiriamos ląstelių linijos pasižymi ir skirtingu atsparumu radioterapijai. Tolimesni tyrimai parodė, kad tiek apoptozė, tiek ląstelės ciklas gali būti svarbūs šių ląstelių radioatsparumui. Mūsų atliktų tyrimų patvirtinimui reikalingi išsamesni molekuliniai tyrimai, siekiant išsiaiškinti, kokie signaliniai keliai ar molekulės atsakingi už mūsų tiriamų ląstelių radioatsparumą. Tai padėtų nuspėti skirtingų potipių reakcijas į spindulinę terapiją. Tuomet būtų naudinga sumažinti radiacinę

dozę pacientams, kurių navikai yra jautresni radioterapijai, kartu sumažėtų normalių aplinkinių audinių pažeidimai bei šalutinis jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis. Radioterapijai atspariems navikams galėtų būti skiriamos papildomos terapinės dozės, siekiant sumažinti naviko atkryčio riziką [33].

Išvados

1. MDA-MB-231 krūties vėžio ląstelių linija pasižymėjo didesniu atsparumu radioterapijai, negu MCF-7 ląstelės.

2. Ląstelės ciklo analizė parodė, kad MDA-MB-231 ląstelių radioatsparumas gali būti susijęs su G2/M ciklo fazės sulauikymu.

3. Po radioterapijos poveikio MCF-7 ląstelėse apoptozė prasidėjo anksčiau ir buvo intensyvesnė, o MDA-MB-231 ląstelės reagavo vėliau ir turėjo uždelstą apoptozinį atsaką.

Literatūra

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;0:1-41. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Pan XB, Chen RJ, Huang ST, Jiang YM, Zhu XD. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of breast conservation therapy followed by radiotherapy in four breast cancer subtypes. *Oncotarget* 2017;8(34):57414-57420. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18205>
- Xiaofeng Dai, Ting Li, Zhonghu Bai, Yankun Yang, Xiuxia Liu, Jinling Zhan, and Bozhi Shi. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 2015; 5(10): 2929-2943.
- Abdel-Hafiz HA. Epigenetic mechanisms of tamoxifen resistance in luminal breast cancer. *Diseases* 2017;5(3):16. <https://doi.org/10.3390/diseases5030016>
- Horton JK, Siamakpour-Reihani S, Lee CT, Zhou Y, Chen W, Geradts J, Fels DR, Hoang P, Ashcraft KA1, Groth J, Kung HN, Dewhirst MW, Chi JT. FAS death receptor: a breast cancer subtype-specific radiation response biomarker and potential therapeutic target. *Radiat Res* 2015;184(5):456-69. <https://doi.org/10.1667/RR14089.1>
- He L, Lv Y, Song Y, Zhang B. The prognosis comparison of different molecular subtypes of breast tumors after radiotherapy and the intrinsic reasons for their distinct radiosensitivity. *Cancer Management and Research* 2019;11:5765-5775. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S213663>
- Chen X, Ma N, Zhou Z, Wang Z, Hu Q, Luo J1, Mei X, Yang Z, Zhang L, Wang X, Feng Y, Yu X, Ma J, Guo X. Estrogen receptor mediates the radiosensitivity of triple-negative breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2017;23:2674-2683. <https://doi.org/10.12659/MSM.904810>
- Guo Q, Zhu D, Bu X, Wei X, Li C, Gao D, Wei X, Ma X, Zhao P. Efficient killing of radioresistant breast cancer cells by cytokine-induced killer cells. *Tumour Biol* 2017;39(3):1010428317695961. <https://doi.org/10.1177/1010428317695961>
- Gray M, Turnbull AK, Ward C, Meehan J, Martínez-Pérez C, Bonello M, Pang LY, Langdon SP, Kunkler IH, Murray A, Argyle D. Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines. *Radiation Oncology* 2019;14(1):64. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1268-2>
- Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(4):928-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>
- Olivares-Urbano MA, Griñán-Lisón C, Marchal JA, Núñez MI. CSC Radioresistance: a therapeutic challenge to improve radiotherapy effectiveness in cancer. *Review. Cells* 2020;9(7):1651. <https://doi.org/10.3390/cells9071651>
- Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, Siegelin MD, Fimognari C, Kumar NB, Dou QP, Yang H, Samadi AK, Russo GL, Spagnuolo C, Ray SK, Chakrabarti M, Morre JD, Coley HM, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG, Amedei A, Nicolai E, Amin A, Ashraf SS, Helferich WG, Yang X, Boosani CS, Guha G, Bhakta D, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Mohammed SI, Keith WN, Bilisland A, Halicka D, Newshean S, Azmi AS. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol* 2015;35 Suppl(0):S78-S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>
- Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci* 2015;16(2):2942-55. <https://doi.org/10.3390/ijms16022942>
- Liu Ch, Nie J, Wang R, Mao W. The cell cycle G2/M block is an indicator of cellular radiosensitivity. *Dose Response* 2019;17(4):1559325819891008. <https://doi.org/10.1177/1559325819891008>
- Comsa S, Cimpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res* 2015;35(6):3147-54.
- Boo L, Ho WY, Ali NM, Yeap SK, Ky H, Chan KG, Yin WF, Satharasinghe DA, Liew WC, Tan SW, Cheong SK, Ong HK. Phenotypic and microRNA transcriptomic profiling of the MDA-MB-231 spheroid-enriched CSCs with comparison of MCF-7 microRNA profiling dataset. *Peer J* 2017;5:e3551. <https://doi.org/10.7717/peerj.3551>
- Braselmann H, Michna A, Heß J, Unger K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat Oncol* 2015;10:223. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0529-y>
- Chen X, Ma N, Zhou Z, Wang Z, Hu Q, Luo J, Mei X, Yang Z, Zhang L, Wang X, Feng Y, Yu X, Ma J, Guo X. Estrogen receptor mediates the radiosensitivity of triple-negative breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2017;23:2674-2683. <https://doi.org/10.12659/MSM.904810>

19. Zhang Q, Kong Y, Yang Z, Liu Y, Liu R, Geng Y, Luo H, Zhang H, Li H, Feng S, Wang X. Preliminary study on radiosensitivity to carbon ions in human breast cancer. *J Radiat Res* 2020;61(3):399-409.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rraa017>
20. Feng FY, Speers C, Liu M, Jackson WC, Moon D, Rinkinen J, Wilder-Romans K, Jagsi R, Pierce LJ. Targeted radiosensitization with PARP1 inhibition: optimization of therapy and identification of biomarkers of response in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(1):81-94.
<https://doi.org/10.1007/s10549-014-3085-5>
21. Zhang Y, Storr SJ, Johnson K, Green AR, Rakha EA, Ellis IO, Morgan DA, Martin SG. Involvement of metformin and AMPK in the radioresponse and prognosis of luminal versus basal-like breast cancer treated with radiotherapy. *Oncotarget* 2014;5(24):12936-49.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2683>
22. Leroy B, Girard L, Hollestelle A, Minna JD, Gazdar AF, Soussi T. Analysis of TP53 mutation status in human cancer cell lines: a reassessment. *Hum Mutat* 2014;35(6):756-65.
<https://doi.org/10.1002/humu.22556>
23. Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* 2007;8(3):235-44.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70074-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70074-8)
24. Mundt AJ, Roeske JC, Chung TD, Weichselbaum RR. Biologic basis of radiation therapy. *Holland-Frei Cancer Medicine Hamilton (ON): BC Decker* 2003.
25. Hyun SY, Jang YJ. P53 activates G1 checkpoint following DNA damage by doxorubicin during transient mitotic arrest. *Oncotarget* 2015;6(7):4804-4815.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.3103>
26. Li J, Yang CX, Mei ZJ, Chen J, Zhang SM, Sun SX, Zhou FX, Zhou YF, Xie CH. Involvement of cdc25c in cell cycle alteration of a radioresistant lung cancer cell line established with fractionated ionizing radiation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(10):5725-30.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.10.5725>
27. Hazawa M, Hosokawa Y, Monzen S, Yoshino H, Kashiwakura I. Regulation of DNA damage response and cell cycle in radiation-resistant HL60 myeloid leukemia cells. *Oncol Rep* 2012;28(1):55-61.
<https://doi.org/10.3892/or.2012.1771>
28. Zhao H, Zhuang Y, Li R, Liu Y, Mei Z, He Z, Zhou F, Zhou Y. Effects of different doses of X ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncol Lett* 2019;17(1):42-54.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.9566>
29. Yang Y, Zhou H, Zhang G, Xiaoying X. Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in cancer radioresistance: updates on the molecular mechanisms. *J Cancer Res Ther* 2019;15:272-7.
30. Rahmanian N, Hosseinimehr SJ, Khalaj A. The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy. *J Biomed Sci* 2016;23(1):88.
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0306-8>
31. Hein AL, Ouellette MM, Yan Y. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival. *Int J Oncol* 2014;45(5):1813-9.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2614>
32. Salehifar E, Hosseinimehr SJ. The use of cyclooxygenase-2 inhibitors for improvement of efficacy of radiotherapy in cancers. *Drug Discov Today* 2016;21(4):654-62.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.019>
33. Horton JK, Siamakpour-Reihani S, Lee CT, Zhou Y, Chen W, Geradts J, Fels DR, Hoang P, Ashcraft KA, Groth J, Kung HN, Dewhirst MW, Chi JT. FAS death receptor: a breast cancer subtype-specific radiation response biomarker and potential therapeutic target. *Radiat Res* 2015;184(5):456-69.
<https://doi.org/10.1667/RR14089.1>

EVALUATION OF RESISTANCE DIFFERENT BREAST CANCER CELL LINES TO RADIOTHERAPY

D. Laukaitienė, A. Vaitkus, A. Savukaitytė, R. Vadeikienė, R. Ugenskienė, A. Inčiūra, E. Juozaitytė

Keywords: breast cancer, resistance, radiotherapy, apoptosis, cell cycle.

Summary

Introduction. Radiotherapy is one of the major modalities for the treatment of human cancers and is used to treat more than 50% all cancerous patients. However, a major contributor to radiotherapy failure and unsuccessful treatment is believed to be resistance of cancerous cells to radiation. One of the key features of cancer cell resistance to radiotherapy is their associated avoidance to apoptotic cell death. Accumulated evidence has suggested that cell cycle also may function as a regulatory process in radioresistance. This study aimed to evaluate the resistance of two MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines to radiation therapy comparing their viability, apoptosis intensity and distribution of cells between phases of the cycle. **Methods.** The radiosensitivity of MCF-7 and MDA-MB-231 cells was compared using colony formation assays. Distribution of cell cycle the cells were stained with propidium iodide and were analyzed by flow cytometry the Muse Cell Analyzer system. To detect apoptosis the cells were stained with annexin V and were analyzed using a Guava PCA flow cytometry. **Results.** Our results suggest that MDA-MB-231 cells had a higher survival rate than MCF-7 cells. A cell cycle analysis has shown that after cells were exposed to irradiation, MDA-MB-231 cells are characterized by the accumulation of cells in G2/M phase and MCF-7 cell cycle was arrested at the G0/G1 phase. Apoptosis studies have shown that MDA-MB-231 cells exhibit a significantly delayed apoptotic response to ionizing radiation compared to MCF-7 cells. **Conclusion.** We concluded that the MDA-MB-231 cells were more radioresistant than the MCF-7 cells.

Correspondence to: danguole.laukaitiene@ismuni.lt