

נוגדן לחלבון Pgp מפחית עמידות של תאים סרטניים לתרופות כימותרפיות

עובד ע"י דר' גילת בריל, יערה שויד, לאה יפרח, טובה מרזר, חגית ברגמן וגליה זר כבוד עפ"י המאמר:

E. B. Mechetner, I. B. Roninson (1992): Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. Proc. Natd. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 5824-5828.

תקציר

חולי סרטן מפתחים לעיתים עמידות לטיפול הכימותרפי. אחד ממנגוני העמידות הוא יכולת התאים הסרטניים לסלק מתוכם את התרופות הכימותרפיות. החלבון P-גליקופורטאין (Pgp) משובץ בקרום התא ומשמש כמשאבה ונמצא כי הוא מעורב בעמידות של תאים סרטניים לתרופות אנטי-סרטניות. מטרת מחקר זה הייתה מציאת פתרון לעמידות התאים הסרטניים על ידי שימוש בנוגדן ייחודי ל-Pgp, בשם UCI2. נבדקה השפעת הנוגדן על שגשוג תאים סרטניים בנוכחות תרופות כימותרפיות. מתוצאות המחקר עולה שהקישור של הנוגדן UCI2 לחלבון Pgp צמצם מאוד את עמידות התאים הסרטניים לתרופה הכימותרפית וינבלסטין, וכתוצאה מכך, כבר בריכוזים נמוכים יחסית של התרופה נגרם הרג מוחלט של התאים. בנוסף, נמצא שהנוגדן מעכב גידול של תאים שעמידים למגוון של תרופות כימותרפיות המסולקות מהתאים באמצעות Pgp. תוצאות הניסויים מעלות את האפשרות של שילוב נוגדן ייחודי ל-Pgp עם תרופות כימותרפיות כשיטת טיפול יעילה בחולי סרטן.

מבוא

אחת הבעיות בטיפול בחולי סרטן המקבלים תרופות כימותרפיות, היא שתאים סרטניים מפתחים עמידות כנגד התרופות הכימותרפיות. אחד ממנגוני העמידות הוא יכולת התאים הסרטניים לסלק מתוכם את התרופות, ועל ידי כך מנעת פעילות התרופות.

החלבון P-גליקופורטאין, או בקיצור: Pgp משובץ בקרום התא ומשמש כמשאבה. חומרים מסיסים בשומן שחודרים לתא מבחוץ מוצאים ע"י המשאבה Pgp בתהליך שדורש אנרגיה (1). בין החומרים ש-Pgp מוציא קיימות גם תרופות שבהן משתמשים בטיפולים כימותרפיים לחולי סרטן (1). נמצא שבתאים שעמידים לתרופות כימותרפיות פעילות ה-Pgp הייתה מוגברת. כמו כן, נמצא שבגידולים רבים רמת הביטוי של הגן שמקודד לחלבון Pgp גבוהה יותר (2). במחקרים נוספים נמצא שיש קשר בין רמת ביטוי גבוהה של הגן שמקודד לחלבון Pgp אצל חולי סרטן לכישלון של הטיפול הכימותרפי (3).

ההבנה ש-Pgp מעורב בהקניית עמידות של תאים סרטניים לתרופות אנטי סרטניות, גרמה לחוקרים רבים להשקיע מאמצים בניסיון לעכב את פעילותו. במחקרים קודמים נמצא שחומרים כימיים כמו הורמונים סטרואידים וציקלוספורין מעכבים את הפעילות של Pgp (4). לשימוש בחומרים אלה יש מספר מגבלות: 1. חלק מהחומרים האלה נקשרים בעצמם ל-Pgp ומסולקים על ידו מן התא. 2. לחלקם יש השפעות נוספות שאינן קשורות לעיכוב של Pgp, כמו רעילות לשריר הלב או דיכוי של מערכת החיסון. עקב כך, יש להשתמש בהם בריכוזים נמוכים יחסית, אולם בריכוזים אלה עיכוב Pgp פחות יעיל (4).

לאור בעיות אלו, יש למצוא פתרון אחר לעיכוב Pgp. אחד הפתרונות האפשריים הוא עיכוב ספיציפי של Pgp באמצעות נוגדן. ההשערה הייתה שנוגדן שייקשר באופן ייחודי לחלבון Pgp ינטרל את פעילותו, והתרופה תישאר בתוך התא.

במחקר זה יצרו החוקרים נוגדן (5) בשם UCI2, שנקשר באופן ייחודי לחלבון Pgp, במטרה לעכב את פעילות המשאבה. מטרת החוקרים הייתה לבחון את יעילות הטיפול הכימותרפיים בשילוב הנוגדן UCI2. במחקר נבדקה מידת שגשוג התאים הסרטניים כמדד לעמידות התאים לתרופות כימותרפיות שונות בנוכחות הנוגדן UCI2.

שיטות וחומרים

תאים: לתרבית התאים השתמשו החוקרים בתאים סרטניים של עכבר שאליהם הוחדר באופן מלאכותי הגן המקודד ל-Pgp של אדם. החדרת הגן גרמה לביטוי מוגבר של Pgp בתאים אלה. התאים גודלו בצלוחיות של תרבית תאים בתוספת של מצע גידול נוזלי. התרופות והנוגדנים ששימשו בניסויים הוספו למצע הגידול.

נוגדנים: הנוגדנים UCI2 ו-UPC10 פותחו על ידי החוקרים, כחלק מההכנות למחקר, על פי שיטת העבודה המקובלת ליצירת נוגדנים בעכברים. הנוגדנים הופקו מסרום העכברים.

תרופות כימותרפיות: התרופות הכימותרפיות וינבלסטין, וינקריסטין, קולכיצין, טקסול, דוקסאורוביצין, אטופוסייד, אקטינומיצין, פורומיציין וגרמיצידין נקנו מאותה חברה מסחרית.

בדיקת שיגשוג התאים בספקטרופוטומטר- בדיקה זו מבוססת על תהליך ביוכימי, המתרחש במיטוכונדריה של תאים חיים. ניתן לעקוב אחר התהליך הביוכימי בעזרת אינדיקטור שמשנה את צבעו מצהוב לסגול. כמות הצבע הסגול בתרבית נמדדת באמצעות מכשיר ספקטרופוטומטר, והיא נמצאת ביחס ישר לכמות התאים החיים והמתרבים בתרבית.

בדיקת שיגשוג התאים ע"י ספירת מושבות - היווצרות מושבות תאים בצלחת פטרי מעידה על יכולת ההתרבות והשגשוג של התאים בתנאים הנבדקים.

מהלך הניסויים

ניסוי 1 – בדיקת שיגשוג תאים סרטניים בנוכחות וינבלסטין באמצעות ספקטרופוטומטר –

תאים סרטניים של עכברים חולקו לשתי קבוצות, כאשר בכל קבוצה נשמר ריכוז זהה של תאים. בכל קבוצה חולקו התאים הסרטניים לששה טיפולים כאשר בכל טיפול ניתן ריכוז שונה של וינבלסטין (0,200,400,600,800,100 ng/ml)

לקבוצת טיפולים אחת הוסף הנוגדן הייחודי לחלבון Pgp (הנוגדן UCI2), ולקבוצת הטיפולים השנייה, ששימשה כבקרה הוסף נוגדן שאינו נקשר לחלבון Pgp (הנוגדן UPC 10). שני הנוגדנים הוספו לתרביות בריכוז זהה (20ug/ml). הניסוי נערך בשלוש חזרות.

נמדדה בליעת אור באמצעות ספקטרופוטומטר כמדד לכמות התאים החיים. אחוז התאים המשגשים חושב ביחס למספר התאים המשגשים בתרבית הבקרה שבה הוסף רק הנוגדן UPC 10 ללא התרופה וינבלסטין.

ניסוי מס. 2 - בדיקת שיגשוג תאים סרטניים בנוכחות וינבלסטין ע"י ספירת מושבות –

בשיטה נוספת נבדק עיכוב שיגשוג תאים סרטניים באמצעות הנוגדן UCI2 בנוכחות התרופה וינבלסטין. בכל אחת מ-3 צלחות פטרי נזרעו 200 תאים סרטניים של עכברים. התאים גודלו בנוכחות התרופה וינבלסטין בריכוז 350ug/ml. בצלחת אחת הוספו נוגדנים מסוג UCI2 (20ug/ml), בצלחת שנייה – נוגדנים מסוג UPC10 (20ug/ml). הצלחת השלישית שמשה כבקרה ולא הוסף נוגדן לתאים. לאחר 11 ימים נספרו המושבות.

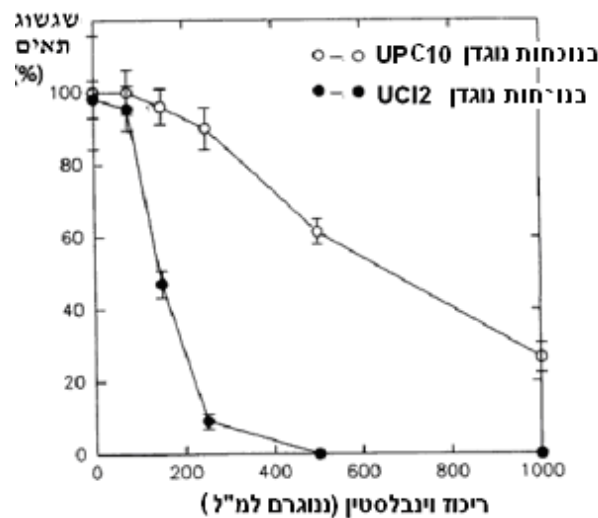
ניסוי מס. 3 - בדיקת שיגשוג תאים סרטניים בנוכחות תרופות כימותרפיות שונות באמצעות ספקטרופוטומטר –

בניסוי זה, נבדק שיגשוג תאים סרטניים שגדלו בתרבית בנוכחות תרופות כימותרפיות שונות והנוגדן UCI2 (20ug/ml) וכבקרה גודלו התאים הסרטניים בנוכחות התרופות הכימותרפיות והנוגדן UPC10 (20ug/ml) שאינו ייחודי ל-Pgp. להלן התרופות: וינבלסטין, וינקריסטין, קולכיצין, טקסול, דוקסאורוביצין, אטופוסייד, אקטינומיצין, פורומיציין וגרמיצידין.

הניסוי נעשה בשלוש חזרות (שלוש תרביות שונות). שגשוג התאים נמדד באמצעות ספקטרופוטומטר וחושב ביחס לשגשוג התאים בבקרה (בנוכחות הנוגדן UPC10 וללא תרופה).

תוצאות

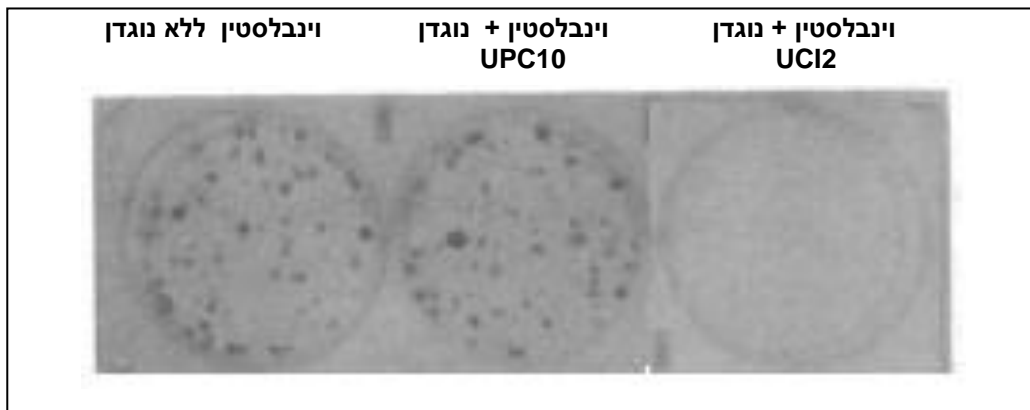
בניסוי מספר 1 בדקו החוקרים את ההשפעה של הנוגדן UCI2 על יכולת התאים להמשיך להתחלק ולהתרבות (שגשוג התאים) בנוכחות תרופה הכימותרפית וינבלסטין. התוצאות מוצגות באיור מס. 1.



איור 1: שגשוג תאים סרטניים בריכוזים שונים של וינבלסטין: הערכים בציר ה-y מייצגים את אחוז התאים המשגשים בניסוי (בתוספת וינבלסטין). מספר התאים הסרטניים המשגשים בתרבית שבה הוסף הנוגדן UPC 10 אך ללא וינבלסטין הוגדר כ-100 אחוזים.

כפי שניתן לראות באיור 1, ללא התרופה (ריכוז 0 ננוגרם למ"ל) לא הייתה לנוגדן UCI2 כל השפעה על שגשוג התאים. עם עליית ריכוז הוינבלסטין נצפה עיכוב משמעותי בשגשוג התאים בנוכחות הנוגדן UCI2. בריכוזים גבוהים ביותר של התרופה וינבלסטין נצפה עיכוב בשגשוג התאים הסרטניים גם בנוכחות הנוגדן UPC10.

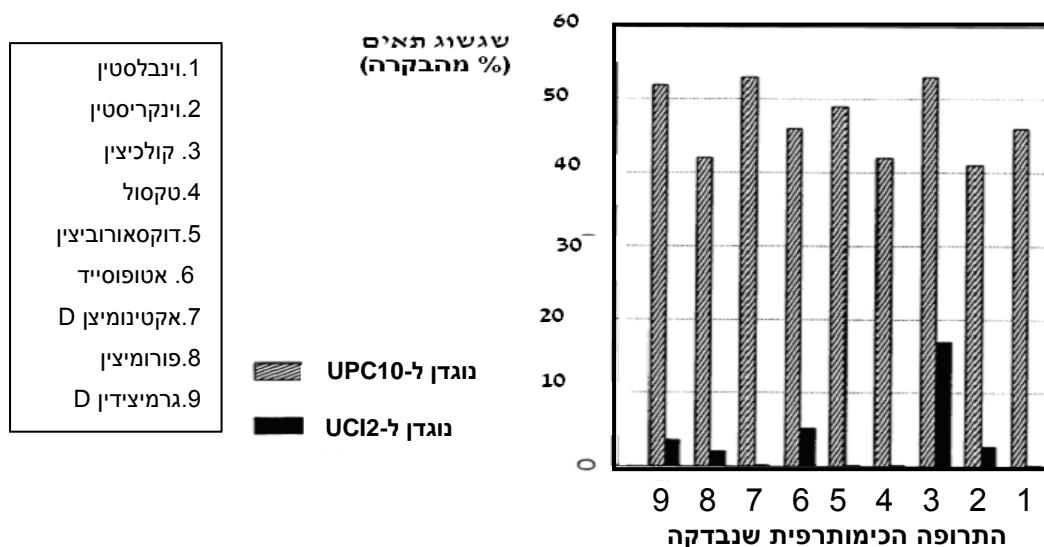
ניסוי מס. 2 החוקרים בדקו את השפעת הנוגדן UCI2 על היווצרות של מושבות של תאים סרטניים בתרבית בנוכחות התרופה וינבלסטין. התוצאות מוצגות באיור 2.



איור 2: עיכוב שגשוג תאים סרטניים באמצעות הנוגדן UCI2: בצלחות פטרי נזרעו 200 תאים בנוכחות וינבלסטין בהוספת נוגדן UCI2, UPC10 או ללא נוגדן. לאחר 11 ימים נספרו המושבות.

באיור 2 ניתן לראות שבתרבית התאים בנוכחות הנוגדן UCI2, שנקשר באופן ייחודי לחלבון Pgp - חל עיכוב מוחלט של היווצרות מושבות של תאים בתרבית (צלחת ימנית). לעומת זאת בתרבית התאים בנוכחות הנוגדן UPC10 (צלחת אמצעית) ובתרבית התאים ללא נוגדן (צלחת שמאלית) נוצרו מושבות של תאים. מושבות אלו מעידות על יכולת ההתרבות והשגשוג של התאים בתנאים אלה.

בניסוי מס. 3 בדקו החוקרים האם העיכוב של שגשוג התאים באמצעות הנוגדן UCI2 יעיל גם לגבי תרופות כימותרפיות נוספות, לא רק וינבלסטיין. לשם כך הוסיפו החוקרים את הנוגדן לתרביות שגודלו עם מגוון של תרופות כימותרפיות שידוע שהן מסולקות מהתאים על ידי החלבון Pgp. התוצאות מתוארות באיור מס. 3.



איור 3: שגשוג תאים סרטניים בנוכחות מגוון תרופות כימותרפיות: תרביות גודלו עם מגוון של תרופות כימותרפיות ושגשוג תאים נמדד באמצעות ספקטרופוטומטר.

באיור 3 ניתן לראות כי בנוכחות הנוגדן UCI2 ותרופות כימותרפיות שונות חל עיכוב משמעותי ביותר בשיגשוג תאים סרטניים. חלק מהתרופות גרמו לעיכוב מוחלט בשיגשוג התאים. בתרביות שהוסף להן הנוגדן הלא ייחודי UPC10 נצפה שגשוג גבוה של התאים.

דיון

בתאים סרטניים התגלתה תופעה של עמידות לתרופות כימותרפיות. ממחקרים בספרות המדעית היו עדויות לכך שהחלבון Pgp, שהוא משאבה בקרום התא, מסלק באופן אקטיבי את התרופות הכימותרפיות שחדרו לתאים (2). מטרת המחקר הייתה מציאת פתרון לעמידות התאים הסרטניים לתרופות כימותרפיות ע"י שימוש בנוגדן ייחודי למשאבה Pgp. במחקר זה נבדקה השפעת הנוגדן UCI2 על שגשוג תאים סרטניים בנוכחות תרופות כימותרפיות. מתוצאות המחקר עולה שהקישור של הנוגדן UCI2 לחלבון Pgp צמצם מאוד את העמידות של תאים סרטניים לתרופה הכימותרפית וינבלסטיין, וכתוצאה מכך, כבר בריכוזים נמוכים יחסית של התרופה נגרם הרג מוחלט של התאים (איור 1 ו-2). בנוסף, נמצא שהנוגדן UCI2 מעכב גידול של תאים שעמידים למגוון של תרופות כימותרפיות המסולקות מהתאים באמצעות Pgp (איור 3).

תוצאות המחקר הנוכחי מעידות שהנוגדן UCI2 שפיתחו החוקרים הוא מעכב ייחודי ומשמעותי ל-Pgp. לאור זאת, יתכן שהנוגדן UCI2 יכול להוות תחליף לעיכוב פעילות המשאבה Pgp באמצעות מעכבים כימיים כגון הורמונים סטרואידים וציקלוספורין ולהקטין את העמידות של תאים סרטניים לתרופות כימותרפיות.

לשימוש בנוגדן ייחודי המעכב את Pgp יכולים להיות יתרונות בהשוואה לעיכוב Pgp באמצעים כימיים:

1. בניגוד לרוב המעכבים הכימיים, לנוגדנים אין השפעה רעילה על תאי הגוף.
2. פגיעה ברקמות בריאות בגוף החולה תהיה קטנה יותר בשימוש בנוגדן בהשוואה לחומרים כימיים. Pgp מבוטא באופן נורמאלי בעיקר ברקמות הפנימיות של צינור העיכול. חומרים כימיים עוברים בדיפוזיה בגוף ויכולים להגיע בקלות למערכת העיכול ולפגוע בתאים. לעומת זאת, נוגדנים כמעט ואינם מגיעים בדיפוזיה למערכת העיכול ולכן הפגיעה ברקמות הבריאות של צינור העיכול קטנה יותר.
3. רוב המעכבים הכימיים של Pgp נקשרים אליו לזמן קצר בלבד, ואז מסולקים מהתאים על ידי Pgp עצמו. לכן עיכוב העמידות הנגרם על ידי המעכבים הכימיים הוא זמני בלבד. לעומת זאת, הקישור של נוגדנים ל-Pgp הוא יחסית יציב, והנוגדנים אינם מסולקים מהתא על ידי Pgp. לכן, השימוש בנוגדנים אמור ליצור עיכוב לזמן ארוך יותר.

תוצאות הניסויים מעלות את האפשרות של שילוב נוגדן ייחודי ל-Pgp עם תרופות כימותרפיות כשיטת טיפול יעילה יותר לחולי סרטן מאשר שימוש במעכבים כימיים. לצורך כך, יש לבצע מחקרי המשך בהם ייבדקו בין היתר: השפעת הנוגדן על עיכוב Pgp בתאים סרטניים מסוגים שונים וכן בתאים סרטניים ממקור אנושי. בהמשך יש לבדוק את ההשפעה ברמת האורגניזם השלם ולבסוף לבצע מחקרים קליניים בחולי סרטן. מחקר נוסף שיבחן את יציבות קישור הנוגדן למשאבה ואת הגורמים המשפיעים על קישור זה יכול להוביל לשיפור ביעילות השימוש בנוגדן כדרך טיפול.

מקורות

1. Roninson, I. B., ed. (1991) *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells* (Plenum, New York).
2. Goldstein, L. J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai S.-L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur G. M., Lieber, M., Cossman, J., Gottesman, M. M. & Pastan I. (1989) Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 116-124
3. Chan, H. S. L., Thorner, P. S., Haddad, G. & Ling, V. (1990) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.* 8, 689-704
4. Ford, J. M. & Hait, W. N. (1990) Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.* 42, 155-199
5. Kearney J. F., Radbruch A., Liesegang B. and Rajewsky K. (1979) A New Mouse Myeloma Cell Line that Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting Hybrid Cell Lines. *The Journal of Immunology* 123, 1548–1550.

רשימת מושגים

משאבה: מבנה חלבוני הממוקם בקרום התא ומאפשר מעבר ברירני של חומרים הייחודיים לו מצד אחד של הקרום אל הצד השני, בניגוד למפל הריכוזים תוך שימוש באנרגיה.

טיפולים כימותרפיים: שימוש בחומרים כימיים על מנת לפגוע בתאים סרטניים. החומרים ניתנים לחולים באופן כזה, שהם מגיעים לזרם הדם ומשם לכל הגוף. החומרים הכימיים פוגעים בתאים בעלי קצב חלוקה גבוה, ולכן בטיפולים כימותרפיים נפגעים גם תאים נורמליים בגוף שהם בעלי קצב חלוקה גבוה.

תאים סרטניים: תאים שעברו סידרה של מוטציות וכתוצאה מכך מתחלקים ללא בקרה ויוצרים גידול. תאים כאלה יכולים לעזוב את הגידול ברקמת המוצא שלהם, לנוע בגוף, לפלוש לרקמות אחרות וליצור שם גידולים חדשים הנקראים גרורות.

גידול: גוש של תאים שהתחלקו ללא בקרה.

ביטוי מוגבר של גן: יצירה מוגברת של RNA על פי הקוד הגנטי ב-DNA.

תרופות אנטי סרטניות: מגוון של חומרים כימיים או ביולוגיים שיכולים לפגוע בהתקדמות מחלת הסרטן. תרופות אנטי סרטניות יכולות לפגוע במגוון תהליכים של מחלת הסרטן: בחלוקה של תאים סרטניים, או ביכולתם לנוע ולהגיע לזרם הדם, או בהספקת הדם לגידול, או שהן יכולות לגרום להרג של התאים הסרטניים וכדומה.

הורמונים סטרואידים: חומרים שומניים בעלי מבנה מולקולרי אופייני של ארבע טבעות, המצויים בבעלי חיים ובצמחים המשפיעים על תהליכים תוך תאיים. לדוגמה: הורמוני המין, כולסטרול.

ציקלוספורין: תרופה שגורמת לדיכוי מערכת החיסון וניתנת לחולים שעברו השתלת איברים.

נוגדן: אחד ממיליוני טיפוסים של חלבונים (מקבוצת אימונוגלובולינים) המיוצר בתאים של המערכת החיסונית, מזהה רכיב זר (אנטיגן) באופן ייחודי, נקשר אליו ומעורב בנטרולו.