

УДК 577.2:616-006:615.277

Количественная оценка синергического взаимодействия противоопухолевых препаратов с сывороткой крови и с эпидермальным фактором роста человека

Д. Э. Камашев^{1,2*}, Е. М. Лебощина³, А. В. Колебошина¹, И. А. Лавриненко⁴, Г. А. Вашанов⁴, Ю. Д. Нечипуренко⁵

¹Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Научно-исследовательский центр мирового класса «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия

⁴Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: dkamashev@gmail.com

Поступила в редакцию 04.03.2025

Принята к печати 20.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27649

РЕФЕРАТ Поиск оптимальной комбинации лекарственных препаратов для эффективного ингибирования роста опухолевых клеток – крайне актуальная задача сейчас, когда таких препаратов становится все больше. Существует несколько подходов к определению характера взаимодействия препаратов, позволяющих установить, является ли оно аддитивным, синергическим или антагонистическим. Здесь описан один из таких подходов и показано, как количественно измерить степень взаимодействия двух препаратов. Показано, что сыворотка периферической крови человека и EGF модулируют активность HER2-таргетных препаратов в ингибировании пролиферации HER2-положительных линий клеток BT474 и SK-BR-3. Проведено сравнение влияния образцов сыворотки крови пациентов с раком молочной железы (РМЖ) и здоровых доноров на действие трастузумаба. Предложенный метод позволяет рассчитать индекс взаимодействия препаратов (*CI*, Combination Index). Среднее значение *CI*, рассчитанное для 17 образцов сыворотки здоровых доноров, составило 0.396, тогда как у 19 образцов сыворотки пациентов с РМЖ среднее значение *CI* оказалось равным 0.214. Эти результаты свидетельствуют о синергическом взаимодействии трастузумаба с сывороткой крови в обеих группах. Обнаружены значимые различия в величинах *CI* между группами здоровых доноров и пациентов с РМЖ: образцы сыворотки крови пациентов усиливали действие трастузумаба в большей степени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА таргетная терапия, HER2, рак молочной железы, сыворотка крови человека, трастузумаб, лапатиниб.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РМЖ – рак молочной железы; EGF – эпидермальный фактор роста; *CI* – индекс взаимодействия препаратов; *CS* – выживаемость клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Теоретические основы и математические подходы к описанию результатов экспериментов

1. *Уравнение Хилла*. Еще в XIX веке был сформулирован закон действующих масс, который нашел

широкое применение в энзимологии, фармакологии, токсикологии, эпидемиологии, социофизике и др. [1, 2]. Опираясь на этот закон в исследовании кислородтранспортной функции крови, Г. Гюфнер (1890) предложил первое уравнение оксигенации гемоглобина [3]. В энзимологии Л. Михаэлис и М. Ментен (1913) сформулировали основное уравнение фер-

ментативной кинетики [4], а в физике И. Ленгмюр (1916) представил аналогичное уравнение мономолекулярной адсорбции [5]. Эти уравнения могут быть приведены к общему виду:

$$\frac{y}{1-y} = kx, \quad (1)$$

или иначе:

$$y = \frac{x}{k^{-1} + x}, \quad (2)$$

где k – константа равновесия реакции.

Следует заметить, что k^{-1} – константа, имеющая различные буквенные обозначения в соответствующих уравнениях в разных областях исследований. k^{-1} – это такое значение аргумента x , при котором y принимает значение $\frac{1}{2}$ ($y = 1 - y$, $y = 0.5$, при $x = k^{-1}$).

Анализ кривых диссоциации оксигемоглобина показал, что уравнение Г. Гюфнера не может удовлетворительно описать данные эксперимента, тогда А. Хилл (1910) предложил эмпирическое уравнение вида [6]:

$$\frac{y}{1-y} = \left(\frac{x}{k^{-1}} \right)^m. \quad (3)$$

Это уравнение также можно переписать в виде:

$$m = \frac{\log y - \log(1-y)}{\log x - \log k^{-1}}. \quad (4)$$

Как следует из (1) и (2), уравнение Хилла связано с законом действующих масс, где показатель степени m формально указывает на порядок реакции. Однако в описании экспериментальных данных этот параметр принимает нецелочисленные значения [6–8]. В дальнейшем такое несоответствие стали объяснять, вводя представление о коэффициенте кооперативности, который связывает число взаимодействующих субъединиц и степень их согласованности при взаимодействии лигандов с макромолекулой белка [9].

Важным достоинством уравнения Хилла можно считать простоту вычисления его параметров из экспериментальных данных. Это позволило применить данное уравнение к решению широкого круга задач: от описания процесса оксигенации и ферментативной кинетики (путем уточнения уравнения Михаэлиса–Ментен) к исследованиям зависимостей типа «доза–эффект» в фармакологии [10–13].

2. Уравнение медианного эффекта Чоу. Уравнение Хилла успешно применяется в фармакокинетике и фармакодинамике [14, 15]. Зависимость «доза–эффект» хорошо описывается этим уравнением. В этом

случае x – это концентрация или доза действующего вещества D (препарата, субстрата, агониста, ингибитора, токсина, яда, лекарственного вещества и т.д.), k^{-1} – это полумаксимальная (медианная) эффективная концентрация (EC_{50}), полумаксимальная концентрация ингибирования (IC_{50}) или эффективная (полуэффективная) доза (ED_{50}) [16, 17].

В дальнейшем Чоу и Талалай систематизировали соотношения, несущие в своей основе закон действующих масс (Гендерсона–Хассельбаха, Хилла, Михаэлиса–Ментен, Скэтчарда), получив унифицированную форму записи соотношений, известную как уравнение медианного эффекта [18–20]. В этом уравнении $x = D$, k^{-1} обозначается как D_m (median effect dose) – доза (концентрация), вызывающая медианный эффект, $y = f_a$ (fraction affected) – доля (мишеней), затронутая воздействием препарата, $1 - y = f_u$ (fraction unaffected) – доля, не затронутая воздействием препарата, а m – параметр, характеризующий форму кривой «доза–эффект».

Уравнение Хилла (3) и (4) можно привести к виду уравнения медианного эффекта, представляя его через отношение f_a к f_u (5) и вычисляя D (6) и f_a (7):

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m} \right)^m, \quad (5)$$

$$D = D_m \left(\frac{f_a}{1-f_a} \right)^{1/m}, \quad (6)$$

$$f_a = \frac{1}{1 + (D_m/D)^m}, \quad (7)$$

и далее логарифмировать к равенству:

$$\log \left(\frac{f_a}{f_u} \right) = \log f_a - \log f_u = m \log D - m \log D_m. \quad (8)$$

Следовательно:

$$m = \frac{\log f_a - \log f_u}{\log D - \log D_m}. \quad (9)$$

3. Аддитивная модель в анализе сочетанного действия препаратов. Концепция исследования синергического или антагонистического взаимодействия двух препаратов построена на идее сопоставления эффекта при их совместном действии $f(x)_{1,2}$ и суммы эффектов этих препаратов, действующих по отдельности $f(x)_1$ и $f(x)_2$, т.е. на аддитивной модели вида:

$$f(x)_{1,2} = f(x)_1 + f(x)_2. \quad (10)$$

Уравнение (10) может быть представлено для аддитивной модели в виде следующего отношения:

$$\frac{(f_a)_{1,2}}{(1-f_a)_{1,2}} = \frac{(f_a)_1}{(1-f_a)_1} + \frac{(f_a)_2}{(1-f_a)_2}. \quad (11)$$

Принимая во внимание, что химическая реакция имеет соответствующий порядок m (5) и (6), тогда:

$$\left[\frac{(f_a)_{1,2}}{(1-f_a)_{1,2}} \right]^{1/m} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2}. \quad (12)$$

Отклонение от аддитивности при сочетанном воздействии химических агентов может быть оценено как относительно их концентрации (дозы), так и вызываемого ими эффекта, что отражено в рекомендациях так называемого «Саарисельского соглашения» [21]. В первом случае оценивается изменение степени выраженности эффекта (аддитивность эффектов, независимость Блисса) относительно аддитивной модели [22], а во втором – изменения дозы (аддитивность доз, аддитивность Лёве) [23]. Последний вариант более практичен в фармакологии и токсикологии, так как позволяет в случае обнаружения синергизма рассчитать коэффициент снижения концентрации действующих веществ при сохранении исходного эффекта. Это особенно актуально по отношению к фармпрепаратам, имеющим выраженное побочное действие.

Количественной мерой взаимодействия препаратов является комбинационный индекс CI (Combination Index) [14]:

$$CI = \frac{D_1}{(D_y)_1} + \frac{D_2}{(D_y)_2}, \quad (13)$$

где D_1 и D_2 – концентрации препаратов 1 и 2, которые используются совместно и при которых достигается степень воздействия $y = f_a$, $(D_y)_1$ и $(D_y)_2$ – концентрации каждого из препаратов 1 и 2, которые по отдельности приводят к той же степени воздействия $y = f_a$.

Значение $CI = 1$ указывает на аддитивность, < 1 – на синергизм и > 1 – на антагонизм соответственно.

Значения величин $(D_y)_1$, $(D_y)_2$ для соответствующего $y = f_a$ могут быть получены как непосредственно из эксперимента, так и теоретически – аппроксимацией по уравнению (6), исходя из наборов экспериментальных данных «доза–эффект».

$DRI_1 = (D_y)_1 / D_1$, это Dose Reduction Index: индекс уменьшения дозы препарата 1 в присутствии препарата 2, важная мера влияния препарата 2 на действие препарата 1.

В этих терминах [14]:

$$CI = \frac{1}{DRI_1} + \frac{1}{DRI_2}. \quad (14)$$

Эти основные принципы применили для исследования действия таргетного противоопухолевого препарата на рост HER2-позитивных клеток, имеющих опухолевое происхождение, а также для оценки влияния факторов роста и сыворотки крови человека на эффективность препарата. Мы исследовали это влияние на действие препарата на 17 образцах сыворотки здоровых доноров и 19 образцах сыворотки пациентов с РМЖ и вычислили CI для каждого образца. Эти измерения свидетельствуют о синергическом взаимодействии препарата с сывороткой крови.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки BT474 культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с 10–15% FBS (Biosera, Франция) и 2 мМ L-глутамина, 4,5 г/л глюкозы, 1% пенициллин-стрептомицина и 10 нг/мл инсулина. Клетки SK-BR-3 культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде RPMI-1640 («ПанЭко») с добавлением 10% FBS (Biosera) и 2 мМ L-глутамина, 4,5 г/л глюкозы, 1% пенициллин-стрептомицина. В экспериментах использовали: трастузумаб (Roche, Швейцария), лапатиниб (Sigma-Aldridge, США), EGF (SciStore, Россия).

В опыте по подсчету числа клеток SK-BR-3 в лунку 24-луночного планшета (1,86 см²) вносили 500 мкл суспензии, содержащей 11000 клеток/мл, на при этом плотность клеток составляет 3000/см² [24].

В опыте по определению клоногенности клеток BT474 клетки высевали в концентрации 800 клеток/мл, по 2 мл на лунку 6-луночного планшета (9,026 см²), при этом плотность клеток равна 174 клетки/см² [25].

Препараты добавляли к клеткам через 16–24 ч после посева.

Планшеты с равным количеством высеванных клеток инкубировали в течение 24 ч перед обработкой EGF HER2-таргетными препаратами или образцами сыворотки крови человека. После 21 дня инкубации образовывались колонии клеток BT474. Среду удаляли, клетки фиксировали 4% формальдегидом в течение 10 мин, окрашивали 0.5% кристаллическим фиолетовым в 60% метаноле и 0.2 × PBS в течение 15 мин и промывали водой. Колонии, содержащие более 50 клеток, обнаруживали и подсчитывали с помощью программного обеспечения openCFU [26]. Выживаемость (CS) рассчитывали как отношение числа колоний в лунке, содержащей препарат, к числу колоний в лунке без препарата.

Все эксперименты проводили как минимум в трех независимых повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В клинической практике противоопухолевые препараты обычно используют не в виде монотерапии, а как комбинацию нескольких препаратов. Поэтому важно определить, будет ли заданная комбинация препаратов более эффективной, чем использование препаратов по отдельности. Это можно протестировать с использованием линий клеток, имеющих опухолевое происхождение.

Часть 1. Измерение взаимодействия двух препаратов при ингибировании пролиферации клеток

План исследования. Для оценки взаимодействия двух препаратов сначала измеряют параметры действия препаратов по отдельности, т.е. вычисляют параметры IC_{50} и m для каждого препарата, а далее измеряют влияние комбинации препаратов на скорость роста клеток и вычисляют CI .

Таким образом, алгоритм для вычисления CI выглядит следующим образом:

1.1. Необходимо оценить IC_{50} и m для каждого из препаратов. Для этого нужно:

1) Инкубировать клетки в присутствии препарата в двух или более концентрациях и без препарата в течение нескольких дней; подсчитать число клеток (колоний); вычислить величину выживаемости:

$$CS = \frac{\text{число клеток после роста в присутствии препарата} - bkg}{\text{число клеток после роста без препарата} - bkg},$$

где bkg – число клеток в момент добавления препарата.

Так измеряют выживаемость клеток, CS , при концентрации препарата D .

2) Рассчитать логарифм $1 / CS - 1$, а также логарифм концентрации препарата (D).

3) Подставить величины в линеаризованное уравнение (8), откуда могут быть вычислены m и IC_{50} :

$$\log\left(\frac{1}{CS} - 1\right) = m \log D - m \log IC_{50}, \tag{15}$$

где IC_{50} – медианная концентрация препарата, при которой выживаемость клеток (или клоногенность) составляет 50%, m – это коэффициент, отражающий характер зависимости роста клеток от концентрации препарата.

Вычислить m по формуле:

$$m = \frac{\log(1/CS_2 - 1) - \log(1/CS_1 - 1)}{\log D_2 - \log D_1}, \tag{16}$$

где CS_1, CS_2 – значения выживаемости при концентрациях препарата D_1, D_2 .

Вычислить IC_{50} по формуле:

$$IC_{50} = \frac{D}{(1/CS - 1)^{1/m}}. \tag{17}$$

Примечание: формула (17) даст одинаковый результат для IC_{50} при подстановке D_1, CS_1 и D_2, CS_2 .

Для расчетов с большим числом концентраций препарата нами был создан файл Excel (см. дополнительные материалы Hill Drug Analyzer (Лист Chou-Talalay) (Приложение). Если измерений мало (2–4), то значения m и D_m можно вычислить также при помощи модели линейной регрессии (функция НАКЛОН) в том же файле Excel (Лист IC).

Зная параметры IC_{50} и m , можно рассчитать зависимость «доза–эффект»:

$$CS = \frac{1}{1 + (D/IC_{50})^m}. \tag{18}$$

1.2. Оценить степень взаимодействия двух препаратов.

Численной оценкой взаимодействия препаратов, определяющей, является ли их взаимное действие аддитивным, синергическим или антагонистическим, служит параметр CI .

Для вычисления CI необходимо:

1) Измерить выживаемость клеток в присутствии двух препаратов. В этом опыте контролем служит действие препаратов по отдельности. Пусть концентрация препарата А = D_{A_real} , концентрация препарата В = D_{B_real} . Для этих условий следует измерить выживаемость клеток CS , т.е. отношение числа клеток (колоний) к числу клеток (колоний), выросших без препарата.

2) После того как выживаемость (CS) клеток в присутствии двух препаратов (в концентрациях D_{A_real} и D_{B_real}) измерена, по формуле (18) следует вычислить, какой должна быть теоретическая концентрация препарата А, D_{A_theor} , чтобы выживаемость была равна этому же значению CS в присутствии только одного препарата А.

$$D_{A_theor} = \left(\frac{1}{CS} - 1\right)^{1/m_A} IC_{50_A}. \tag{19}$$

Аналогично вычисляется D_{B_theor} :

$$D_{B_theor} = \left(\frac{1}{CS} - 1\right)^{1/m_B} IC_{50_B}. \tag{20}$$

Расчет параметров IC_{50_A} и IC_{50_B} проводят так, как это описано в п. 1.1 по результатам контроля с использованием каждого из препаратов по отдельности. Важно, чтобы IC_{50} измеряли именно в этом опыте, тогда как в качестве m_A и m_B можно также использовать параметры, вычисленные в предварительных опытах.

Для расчета степени взаимодействия (CI) остается подставить полученные величины в формулу:

$$CI = \frac{D_{_A_real}}{D_{_A_theor}} + \frac{D_{_B_real}}{D_{_B_theor}}. \quad (21)$$

Здесь $D_{_A_real}$ и $D_{_B_real}$ – концентрации веществ А и В в комбинации.

Так как производить расчет вручную трудно, в дополнительных материалах мы создали файл Excel, в который достаточно вставить только концентрации $D_{_A_real}$ и $D_{_B_real}$ препаратов и измеренные значения CS .

Заметим, что если один из препаратов (А) слабо действует на выживаемость (тогда $D_{_A_theor} \gg IC_{50_A}$), то $CI = IC_{50}$ (препарата добавленного в одиночку) / IC_{50} (препарата, добавленного вместе с препаратом А).

Это и объясняет физический смысл CI – во сколько раз больше требуется препарата В, если ему «мешает» действие препарата А.

В результате имеем: если CI равно 1, то между препаратами аддитивное взаимодействие, т.е. они действуют независимо друг от друга. Если $CI > 1$, то между препаратами антагонистическое взаимодействие, т.е. они мешают друг другу. Если $CI < 1$, то между препаратами синергическое взаимодействие, т.е. они усиливают действие друг друга.

Часть 2. Взаимодействие лапатиниба и EGF при ингибировании пролиферации клеток SK-BR-3

Семейство рецепторов HER включает четыре белка: EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), HER2, HER3 и HER4 [27]. Известно, что короткие (7–8 кДа) белки, факторы роста способны связываться с этими рецепторами и активировать их, вызывая пролиферацию клеток [28]. Самым распространенным является эпидермальный фактор роста, EGF.

Рак молочной железы (РМЖ) в 15–20% случаев характеризуется сверхэкспрессией HER2 [29]. Для лечения РМЖ такого типа в качестве стандарта одобрено применение гуманизированного моноклонального антитела трастузумаб [30, 31]. В терапии РМЖ применяют также лапатиниб, таргетный препарат, блокирующий активацию как HER2, так и EGFR.

Нами оценено действие препаратов трастузумаб и лапатиниб на скорость роста сверхэкспрессирующих HER2 (HER2+) клеточных линий РМЖ. Использовали линии BT474 (происходит от протоковой карциномы) и SK-BR-3 (происходит от плоскоклеточного рака). Было измерено взаимодействие этих препаратов с EGF и с сывороткой крови человека.

Изучали влияние лиганда EGF или сыворотки крови человека на таргетные препараты, поскольку ранее было показано, что они модулируют действие таргетных препаратов на клетки A431 [32]. Отмечено также, что трастузумаб ингибирует пролиферацию HER2+ клеток SK-BR-3 и BT474 как в отсутствие, так и в присутствии EGF, хотя количественные оценки параметров взаимодействия препаратов не проведены [33].

Сначала мы исследовали действие лапатиниба как единственного препарата. Перед добавлением препарата посчитали число клеток в контрольной лунке для определения фонового значения. К стандартной среде добавили препарат и после шести дней инкубации провели подсчет клеток при нескольких концентрациях препарата. Время инкубации выбирали эмпирически. Оказалось, что когда клетки SK-BR-3 инкубируют более шести дней, то контрольная лунка достигает конfluence и число клеток далее не увеличивается – и не может служить контролем. При инкубации менее шести дней уменьшается соотношение между числом клеток и исходным числом клеток (в день добавления препарата). Это снижение обусловлено тем, что многие препараты вызывают остановку роста клеток, не приводя к их немедленному отслоению и гибели, поэтому соотношение между измеренным числом клеток и числом клеток перед добавлением препарата растет с течением времени.

После подсчета клеток мы определили

$$CS = \frac{\text{число клеток после роста в присутствии препарата(ов) (сыворотки и т.д.)} - bkg}{\text{число клеток после роста без препарата} - bkg}.$$

Здесь bkg – число клеток в день добавления препарата. Если $CS < 0$, то следует считать, что $CS = 0$, в этом случае препарат вызывает отслоение клеток от подложки.

На рис. 1 показана зависимость выживаемости клеток SK-BR-3 от концентрации лапатиниба, а также кривые роста, рассчитанные с помощью уравнения (18). Видно, что значение m отражает крутизну падения выживаемости с ростом концентрации. При $m = 1$ кривая «доза–эффект» описывает реакцию первого порядка, при $m < 1$ кривая

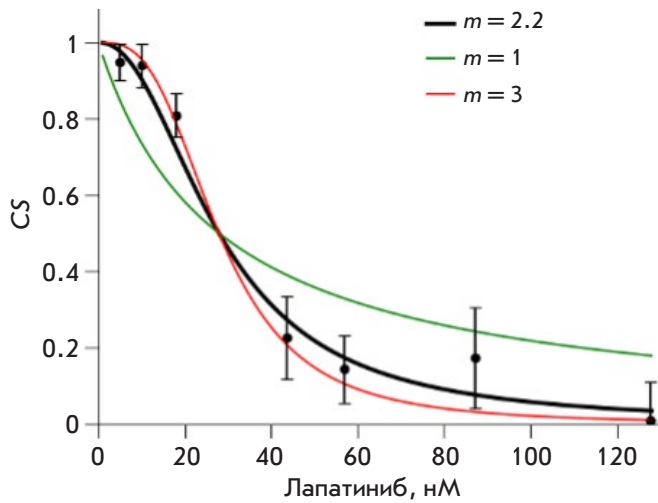


Рис. 1. Выживаемость (CS) клеток SK-BR-3, инкубируемых с лапатинибом в возрастающих концентрациях (0–150 нМ). Зависимость числа клеток от концентрации препарата рассчитывали по трем повторениям, нормированным по отношению к условиям без препарата. Приведены средние значения (\pm стандартные отклонения). Также приведены три кривые роста клеток (CS) в зависимости от концентрации препарата при $m = 1$, $m = 3$ и $m = 2.2$, рассчитанные с помощью формулы (18). Последняя величина ($m = 2.2$), рассчитанная по формуле (16), точнее отражает зависимость роста клеток от концентрации препарата. Рассчитанный $IC_{50} = 28$ нМ (формула (17))

спадают более плавно, а при $m > 1$ выживаемость более резко зависит от концентрации препарата.

Точка, где $D = 0$, $CS = 1$, не входит в график $CS(D)$. Опыт при $D = 0$ нужен для нормирования (чтобы получить CS, исходя из измеренного числа клеток). Поэтому из графика в логарифмической шкале следует удалять точку $(\log(0), 1)$, чтобы избежать разрыва.

Далее мы провели эксперименты, в которых клетки SK-BR-3 обрабатывали совместно EGF и лапатинибом и рассчитали параметры взаимодействия препаратов (рис. 2). В отсутствие EGF лапатиниб эффективно ингибирует рост клеток, что показано на графике в точке со значением концентрации EGF, равной 0.

Часть 3. Влияние ошибок измерения скорости роста клеток на расчет параметров ингибирования IC_{50} и m

При подсчете числа клеток или колоний погрешность измерения будет не меньше $1/\sqrt{N}$, где N – число подсчитанных клеток. Например, для погрешности 10% следует учесть хотя бы 100 клеток. Погрешность вычисления IC_{50} не равна погрешности эксперимента.

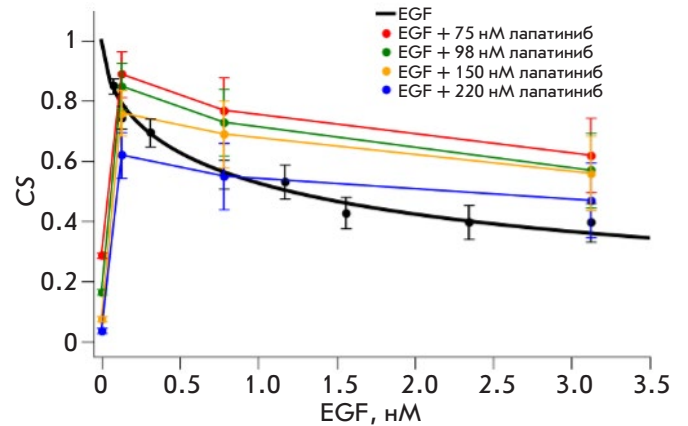


Рис. 2. Выживаемость (CS) клеток SK-BR-3 в присутствии возрастающих концентраций EGF без лапатиниба (толстая черная линия) и в присутствии указанных концентраций лапатиниба (75, 98, 150 и 220 нМ, тонкие линии). Зависимость роста клеток от концентрации препарата рассчитывали по результатам трех независимых экспериментов, нормированным по отношению к условиям без препаратов. Приведены средние значения (\pm стандартные отклонения). Для EGF рассчитанные параметры равны $IC_{50} = 1.2$ нМ, $m = 0.6$. Параметры получены с помощью скрипта 1 из дополнительных материалов согласно формулам (16) и (17). Параметр CI взаимодействия EGF и лапатиниба рассчитан посредством скрипта 2 из дополнительных материалов согласно формуле (21), значение $CI = 26.6$, что соответствует сильному антагонизму

Из уравнения (6) мы получили формулы для погрешности вычисления IC_{50} и m :

$$\Delta(IC_{50}) = \frac{\Delta(CS)}{(1-CS)m + \log(1/CS-1)\Delta(CS)^2} \cdot \frac{1}{(m(1-CS)(1-CS_1)(\log D_1/D_2))} \quad (22)$$

Зависимость точности определения IC_{50} от CS показана на рис. 3. Для $m = 2$ точность определения IC_{50} равна погрешности измерения CS при $CS = 0.5$.

При CS между 0.25 и 0.75 точность определения IC_{50} равна 10–20% при погрешности измерения CS = 10%. При низких концентрациях препарата, когда CS больше 0.75, точность измерения CS уже в 2 раза превосходит погрешность измерения. Поэтому измерение при таких низких концентрациях препарата бесполезны для определения IC_{50} .

При высоких концентрациях препарата, когда CS меньше 0.25, погрешность измерения CS может стать высокой, поскольку она $> 1/\sqrt{N}$; клеток в контроле должно быть достаточно много. Если CS меньше 0.25, то 100 клеток при данном CS для погрешности в 10% соответствует 400 клеткам в контроле.

Точность определения m обычно составляет $1/2$ погрешности определения CS.

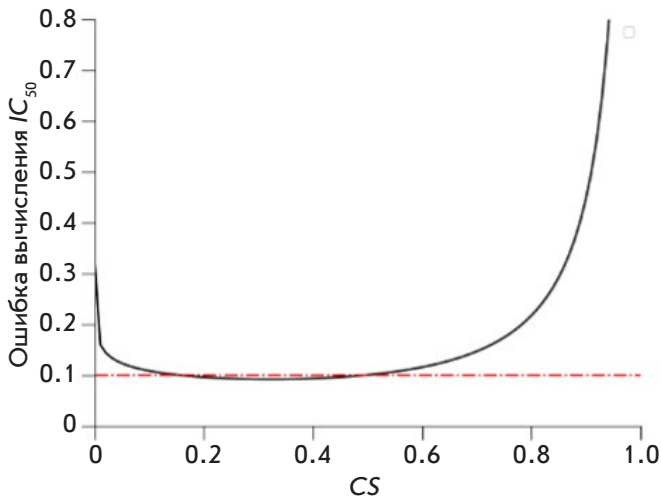


Рис. 3. Зависимость ошибки вычисления IC_{50} препарата от измеренного отношения числа клеток (колоний) в присутствии и в отсутствие препарата (CS). Ошибка измерения CS принята за 0.1

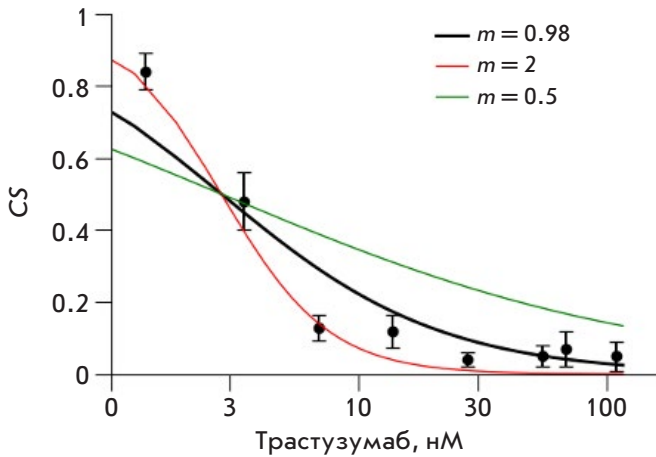


Рис. 4. Выживаемость (CS) клеток BT474 в присутствии трастузумаба в возрастающих концентрациях (0–110 нМ). Зависимость числа колоний от концентрации препарата рассчитывали по результатам трех независимых экспериментов, нормированным по отношению к условиям без препарата. Показаны средние значения (\pm стандартные отклонения). Также приведены три кривые, отражающие рассчитанную с помощью формулы (18) зависимость роста клеток (CS) от концентрации препарата при $m = 0.5$, $m = 2$ и $m = 0.98$. Последнюю величину $m = 0.98$ рассчитывали по формуле (16). Видно, что эта кривая наиболее точно отражает зависимость роста клеток от концентрации препарата. Рассчитанный $IC_{50} = 3.5$ нМ (формула (17))

Часть 4. Влияние сыворотки крови человека на действие трастузумаба на клоногенность клеток BT474

Мы изучали влияние сыворотки крови человека на действие HER2-таргетного моноклонального ан-

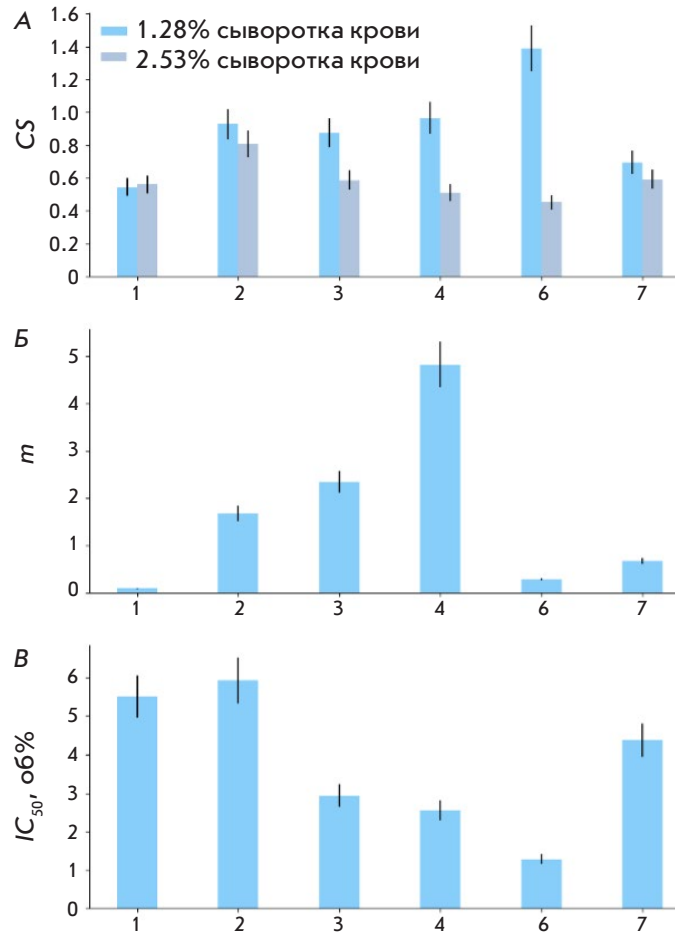
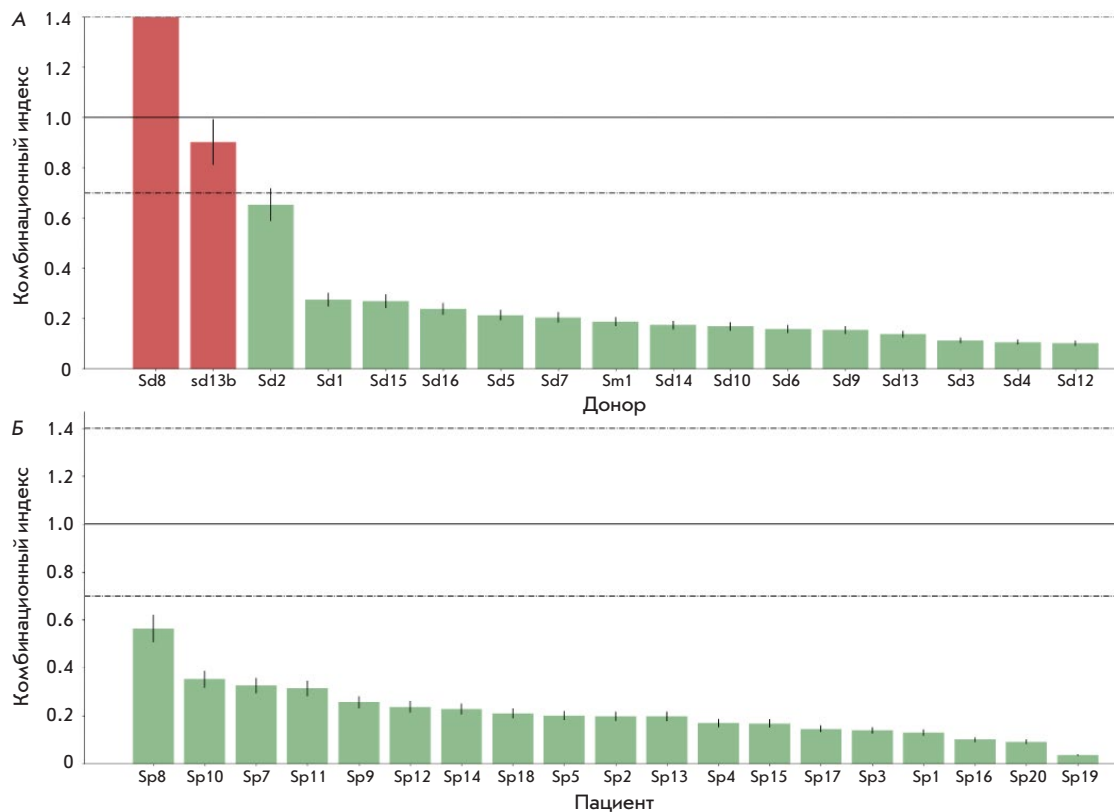


Рис. 5. Влияние образцов сыворотки крови человека на рост клеток BT474. Панель А – клоногенность клеток в среде, содержащей образцы сыворотки крови человека (обозначены как 1–7) в концентрации 1.28 и 2.53% объемных %. Столбцы представляют среднюю клоногенность, полученную для каждого образца, нормированную по контрольным условиям (добавлен 1.28 и 2.53% FBS). Панель Б – параметр m , рассчитанный с помощью скрипта 1 из дополнительных материалов согласно уравнению (16), для каждого образца сыворотки. Панель В – параметр IC_{50} , рассчитанный с помощью скрипта 1 из дополнительных материалов согласно уравнению (17). Ошибки вычисления параметров вызваны отклонением экспериментальных данных от средних значений и показаны планками погрешностей

титела трастузумаб на клоногенность клеток BT474. Сначала измеряли параметры действия трастузумаба на клоногенность в стандартной среде роста (рис. 4) и рассчитывали параметры IC_{50} и m . Из этого графика, построенного в полулогарифмической шкале, удалена точка (log(0), 1).

Далее измерили влияние образцов сыворотки крови человека на клоногенность клеток без трастузумаба (рис. 5), для каждого образца сыворотки определяли также параметры IC_{50} и m .

Рис. 6. Влияние образцов сыворотки крови человека на действие трастузумаба (3.83 нМ) на рост клеток BT474. Значение CI рассчитано с помощью (21) (см. скрипт 2 из дополнительных материалов). Колонки показывают значения CI для каждого образца сыворотки здоровых доноров (панель А) и пациентов с РМЖ (панель Б). Ошибки вычисления параметров вызваны отклонением экспериментальных данных от средних значений и показаны планками погрешностей



Зная параметры IC_{50} и m образцов сыворотки крови человека и трастузумаба, мы можем определить, является ли воздействие сыворотки крови человека на ингибирование роста клеток трастузумабом аддитивным, синергическим или антагонистическим. Ранее мы измерили влияние образцов сыворотки крови как здоровых доноров, так и пациентов с РМЖ на действие трастузумаба на клетки BT474 [34]. На основе этих данных с помощью скрипта 2 из дополнительных материалов были рассчитаны согласно формуле (21) значения CI для каждого образца (рис. 6).

Обнаружено, что 15 из 17 образцов здоровых доноров оказывают синергический эффект на действие трастузумаба на клетки BT474 ($CI < 0.65$). Все 19 образцов пациентов с РМЖ оказывали синергический эффект на действие трастузумаба на клетки BT474 ($CI < 0.55$).

ВЫВОДЫ

Нами описан алгоритм количественного измерения взаимного влияния препаратов, а именно, вычисления индекса взаимодействия препаратов, CI , а также предложены инструменты его вычисления.

Анализ экспериментальных данных посредством предложенного алгоритма показал, что лапатиниб ингибирует рост клеток SK-BR-3 с $IC_{50} = 28$ нМ,

$m = 2.2$; EGF ингибирует рост клеток SK-BR-3 с $IC_{50} = 1.2$ нМ, $m = 0.6$. Взаимодействие лапатиниба и EGF антагонистично, $CI = 26.6$, таким образом, присутствие EGF препятствует действию лапатиниба на рост раковых клеток.

Трастузумаб ингибирует рост клеток BT474 с $IC_{50} = 3.5$ нМ, $m = 0.98$; образцы сыворотки крови человека ингибируют рост клеток BT474 с IC_{50} от 1 до 6 об %, m от 0.1 до 5 в зависимости от образца.

Сыворотка крови человека усиливает ингибирующее действие трастузумаба на клоногенность клеток BT474. Для 17 образцов сыворотки доноров среднее значение $CI = 0.40$, а для 19 образцов сыворотки крови пациентов РМЖ среднее $CI = 0.21$. То есть значение CI между группами различается в 1.9 раза. Обнаружены существенные вариации во влиянии как образцов сыворотки крови разных пациентов, так и среди здоровых доноров. ●

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИОКТР (Госзадания) 124031500019-8.

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27649>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Voit EO, Martens HA, Omholt SW. 150 years of the mass action law. *PLoS Comput Biol.* 2015;11(1):e1004012. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004012
2. Ferner RE, Aronson JK. Cato Guldberg and Peter Waage, the history of the Law of Mass Action, and its relevance to clinical pharmacology. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;81(1):52-55. doi: 10.1111/bcp.12721
3. Hüfner G. Ueber das Gesetz der Dissociation des Oxyhaemoglobins und über einige daran sich knüpfende wichtige Fragen aus der Biologie. *Arch Physiol.* 1890;31:1-27.
4. Michaelis L, Menten ML. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem z.* 1913;49(333-369):352.
5. Langmuir I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *J Amer Chem Soc.* 1916;38(11):2221-2295.
6. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J of Phys.* 1910;40:i-vii.
7. Endrenyi L, Fajsz C, Kwong FH. Evaluation of Hill slopes and Hill coefficients when the saturation binding or velocity is not known. *Eur J Biochem.* 1975;51(2):317-28. doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb03931.x
8. Weiss JN. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 1997;11(11):835-841. doi: 10.1096/fasebj.11.11.9285481
9. Lavrinenko IA, Vashanov GA, Nechipurenko YD. New Interpretation of the Hill Coefficient. *Biophysics.* 2022;67(2):171-174. doi: 10.1134/S0006350922020142
10. Bordbar AK, Saadati Z, Sohrabi N. Analysis of ligand binding process using binding capacity concept. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(4):963-970. doi: 10.18388/abp.2004_3529
11. Srinivasan S, Waghugh FH, Idicula-Thomas S, Venkatesh KV. A steady-state modeling approach for simulation of antimicrobial peptide-cell membrane interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2020;1862(4):183242. doi: 10.1016/j.bbame.2020.183242
12. Lavrinenko IA, Vashanov GA, Buchelnikov AS, Nechipurenko YD. Cooperative Oxygen Binding with Hemoglobin as a General Model in Molecular Biophysics. *Biophysics.* 2022;67(3):327-337. doi: 10.1134/S0006350922030113
13. Lavrinenko IA, Vashanov GA, Hernandez Caceres JL, Nechipurenko YD. Mathematical models describing oxygen binding by hemoglobin. *Biophys Rev.* 2023;15(5):1269-1278. doi: 10.1007/s12551-023-01110-4
14. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55. doi: 10.1016/0065-2571(84)90007-4
15. Goutelle S, Maurin M, Rougier F, et al. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2008;22(6):633-648. doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x
16. Chang JB, Quinnes KM, Realubit R, et al. A novel, rapid method to compare the therapeutic windows of oral anticoagulants using the Hill coefficient. *Scientific Reports.* 2016;6(1):29387. doi: 10.1038/srep29387
17. Lavrinenko IA, Vashanov GA, Nechipurenko YD. New Mathematical Model to Describe Hemoglobin Oxygenation. *Biophysics.* 2022;67(3):347-352. doi: 10.1134/S0006350922030125
18. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* Sep 2006;58(3):621-681. doi: 10.1124/pr.58.3.10
19. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440-446. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
20. Chou T-C. Chapter X - Multidisciplinary examples of applications: Papers using the MAL-PD/BD/CI/BI theory/method. In: Chou T-C, ed. *Mass-Action Law Dynamics Theory and Algorithm for Translational and Precision Medicine Informatics.* Academic Press; 2024:181-218.
21. Greco W, Unkelbach HD, Pösch G, et al. Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: The Saarisekä agreement. *Arch Complex Environ Stud.* 1992;4:65-69.
22. Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology.* 1939;26(3):585-615. doi: 10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
23. Loewe S, Muischnek H. Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.* 1926;114(5):313-326. doi: 10.1007/BF01952257
24. Kamashev D, Shaban N, Zakharova G, et al. Lapatinib-induced enhancement of mitochondrial respiration in HER2-positive SK-BR-3 cells: mechanism revealed by analysis of proteomic but not transcriptomic data. *Front Mol Biosci.* 2024;11:1470496. doi: 10.3389/fmolb.2024.1470496
25. Kamashev D, Sorokin M, Kochergina I, et al. Human blood serum can donor-specifically antagonize effects of EGFR-targeted drugs on squamous carcinoma cell growth. *Heliyon.* Mar 2021;7(3):e06394. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06394
26. Geissmann Q. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PLoS One.* 2013;8(2):e54072. doi: 10.1371/journal.pone.0054072
27. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:195-217. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440
28. Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, et al. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11). doi: 10.3390/ijms19113491
29. Asif HM, Sultana S, Ahmed S, et al. HER-2 Positive Breast Cancer - a Mini-Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(4):1609-1615. doi: 10.7314/apjcp.2016.17.4.1609
30. Krop IE, Kim SB, Martin AG, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):743-754. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30313-3
31. Shaban N, Kamashev D, Emelianova A, Buzdin A. Targeted Inhibitors of EGFR: Structure, Biology, Biomarkers, and Clinical Applications. *Cells.* 2023;13(1). doi: 10.3390/cells13010047
32. Kamashev D, Shaban N, Lebedev T, et al. Human Blood Serum Can Diminish EGFR-Targeted Inhibition of Squamous Carcinoma Cell Growth through Reactivation of MAPK and EGFR Pathways. *Cells.* 2023;12(16). doi: 10.3390/cells12162022
33. Diermeier S, Horvath G, Knuechel-Clarke R, et al. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res.* 2005;304(2):604-619. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.008
34. Kamashev D, Shaban N, Suntsova M, et al. Human Blood Serum Inhibits Ductal Carcinoma Cells BT474 Growth and Modulates Effect of HER2 Inhibition. *Biomedicines.* 2022;10(8). doi: 10.3390/biomedicines10081914